ORSAY

n° d'ordre : 1668

université de Paris-Sud

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le grade de Docteur ès Sciences Physiques

PAR

Magali J U L L I E N - B E Y N E T

SUJET : Quelques applications de la diffusion quasi élastique de la lumière en biologie.

soutenue le 9 Juin 1976 devant la Commission d'examen

Mlle J. YON Président

Mme M. VEYSSIE

MM. H. BUC

P.G. de GENNES

B. JACROT

E. SHECHTER

ORSAY

n° d'ordre :

université de Paris-Sud

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le grade de Docteur ès Sciences Physiques

PAR

Magali J U L L I E N - B E Y N E T

SUJET : Quelques applications de la diffusion quasi élastique de la lumière en biologie.

soutenue le 9 Juin 1976 devant la Commission d'examen

Mlle J. YON Président

Mme M. VEYSSIE

MM. H. BUC

P.G. de GENNES

B. JACROT

E. SHECHTER

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Lorsque, après des études de physique, j'ai souhaité m'orienter vers la biologie, Monsieur le Professeur Tonnelat m'a accueillie dans son laboratoire ; qu'il en soit ici remercié. C'est grâce à Sylvanie Guinand, Annette Fourcade, Bernard Arrio et Georges Durand que ce travail a pu commencer ; même si, par la suite, l'occasion de travailler avec eux ne s'est guère présentée, je n'oublie pas leur aide précieuse et déterminante.

Ce travail a été effectué, sous la direction de Mademoiselle Yon, au laboratoire d'enzymologie physico-chimique et moléculaire ainsi qu'au laboratoire de physique des solides.

Jeannine Yon et tous les membres de son laboratoire ont contribué à la réalisation de cette thèse ; leur participation matérielle, les fructueuses discussions que j'ai pu avoir avec eux, le dynamisme et l'ambiance qui règnent dans le groupe m'ont beaucoup aidée. Je les remercie tous très sincèrement et plus particulièrement Darwin Thusius avec lequel j'ai effectué une partie de ce travail.

Georges Durand et ses collaborateurs ont montré une très grande disponibilité à mon égard ; qu'ils soient assurés de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier les différents membres du jury pour l'accueil qu'ils ont bien voulu me réserver chaque fois que je suis venue les importuner.

Enfin, je voudrais remercier Alain Carrette pour la compétence et l'habileté dont il a fait preuve lors de la réalisation d'une partie du montage optique ainsi que Madame Niobet pour la rigueur et la gentillesse avec lesquelles elle a frappé le manuscrit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548102_0035

INTRODUCTION

En biologie, l'étude structurale des macromolécules (ou de systèmes plus élaborés) tient une place très importante. Cette approche permet, en général, de mieux comprendre le rôle ou les propriétés fonctionnelles des édifices complexes. Elle donne, en particulier, la possibilité d'étudier certains phénomènes d'adaptabilité conformationnelle qui ont souvent des effets régulateurs au niveau de l'activité cellulaire.

A l'heure actuelle, la diffraction des rayons X par les cristaux est certainement la méthode qui a donné le plus d'informations dans ce domaine. On connait un nombre croissant de structures tridimensionnelles avec une résolution de l'ordre de 2 Å ; des changements de conformation de quelques angströms ont pu être décelés (sur l'hémoglobine, par exemple, après fixation de l'oxygène). Cette méthode présente cependant quelques limites. Elle nécessite l'obtention de cristaux et toutes les protéines ne cristallisent pas ; c'est une méthode statique, donc peu adaptée à l'étude de mouvements intramoléculaires ; elle ne permet pas de localiser les protons.

A côté de cette technique, qui a l'avantage de fournir des renseignements à la fois sur la forme générale de la molécule et sur la localisation des différents atomes, il en existe un grand nombre, souvent complémentaires, mais dont les possibilités semblent plus restreintes pour l'instant. Certaines, comme les modifications chimiques, la spectrophotométrie, ou la R.M.N., donnent essentiellement des informations à l'échelle locale, c'est-à-dire au niveau de quelques acides aminés. D'autres, comme la microscopie électronique, l'ultracentrifugation ou la diffusion de la lumière donnent des informations sur la conformation globale.

La diffusion quasi élastique de la lumière (D.Q.E.L.) s'appelle aussi diffusion de lumière ou diffusion Rayleigh. Il y a encore une quinzaine d'années, la seule mesure possible était la mesure de l'intensité diffusée. C'est la découverte de sources lumineuses cohérentes, les lasers, associée à l'élaboration d'une nouvelle méthode spectroscopique, les battements de photons, qui ont permis d'en étudier la répartition spectrale. La diffusion Rayleigh a alors été qualifiée de quasi élastique, par opposition aux diffusions Raman et Brillouin qui sont inélastiques.

Alors que les intensités donnent des informations sur les amplitudes des fluctuations au niveau de l'échantillon, l'analyse spectrale est l'un des moyens les plus puissants pour en étudier les *cinétiques*. Dans le cas de solutions protéiques, les fluctuations observables par D.Q.E.L. sont essentiellement les fluctuations de concentration dues à la diffusion de translation, à l'existence éventuelle d'un équilibre chimique entre plusieurs espèces et les fluctuations d'orientation si la molécule est anisotrope. Dans le cas de systèmes de dimensions beaucoup plus importantes que celles des protéines (cellules, fibres, par exemple) des fluctuations au niveau de la structure interne peuvent être observées.

Nous présentons dans le chapitre I les bases théoriques du phénomène de diffusion de la lumière. Le dispositif expérimental utilisé pour son observation est décrit dans le chapitre II. Dans les chapitres III, IV et V sont exposées les différentes études abordées :

- structure d'un enzyme tétramérique, la β-galactosidase d'E. coli ;
- polymérisation linéaire d'un enzyme, la glutamate déshydrogénase de foie de boeuf ;
- taille de vésicules membranaires obtenues à partir du Réticulum Sarcoplasmique de muscle strié de lapin.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - PRESENTATION THEORIQUE 1

I - Article : diffusion quasi élastique de la lumière
Application à des problèmes biologiques
Biochimie (1975) 57, 429-436.
Magali Jullien et *Bernard Arrio*. 2

II - Introduction aux fonctions de corrélation :
1) Propriétés statistiques d'une fluctuation 10
2) Propriétés statistiques du champ diffusé et du photocourant correspondant. 12

III - Références bibliographiques pour le chapitre I 14

CHAPITRE II - MISE AU POINT D'UN DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR L'OBSERVATION DE LA DIFFUSION QUASI ELASTIQUE DE LA LUMIERE EN BIOLOGIE.

I - Description générale du dispositif expérimental 15

II - Caractéristiques des divers éléments :
1) La source lumineuse : laser Hélium-Néon 16
2) Les dimensions du volume éclairé : problème de la cohérence spatiale 16
3) La détection : photomultiplicateur 19
4) Le corrélateur 20

III - Méthodes d'analyse des résultats expérimentaux :
1) Cas d'une solution monodisperse : méthode itérative. . 24
2) Cas d'une solution polydisperse : méthode des cumulants 26

IV - Références bibliographiques pour le chapitre II 29

CHAPITRE III - APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE DE LA CONFORMATION D'UN ENZYME OLIGOMERIQUE : LA β-GALACTOSIDASE d'E.COLI.

I - Introduction 31

II - Matériel et méthodes
1) L'enzyme :
a) préparation 32
b) caractéristiques cinétiques 32

2) Méthodes d'analyse

a) électrophorèses 33

b) ultracentrifugations 33

3) Méthodes de purification

a) dénaturation suivie d'une renaturation 34

b) gradient de sucrose 34

III - Existence de plusieurs formes oligomériques

1) Données bibliographiques 35

2) Préparation de l'enzyme 35

3) Etude d'un mélange tétramère polymère supérieur . . . 35

4) Purification du tétramère

a) dénaturation suivie d'une renaturation . 37

b) gradient de sucrose. 39

IV - Etude de quelques structures

1) Tétramère 41

2) Monomère 44

3) Polymère supérieur 45

4) Effet du magnésium sur la structure 46

5) Effet du pH. 46

V - Conclusion 47

Appendice 49

VI - Références bibliographiques pour le chapitre III 50

CHAPITRE IV - APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE DE LA POLYMERISATION LINEAIRE D'UN ENZYME : LA GLUTAMATE DESHYDROGENASE DE FOIE DE BOEUF.

I - Introduction 53

II - Article : Mechanism of bovine liver glutamate Dehydrogenase self-assembly. III Characterisation of the association-dissociation stoichiometry with quasi-elastic light scattering. J. Mol. Biol. (1976)101,397-416

Magali Jullien and *Darwin Thusius* 54

III - Conclusion 74

IV - Références bibliographiques pour le chapitre IV 75

CHAPITRE V - APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE D'UNE PREPARATION MEMBRANAIRE : VESICULES DE RETICULUM SARCOPLASMIQUE DE MUSCLE DE LAPIN.

I - Introduction 77

II - Article : description by quasi elastic laser light scattering of a biological preparation : Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. J. Membrane Biol. (1974) 18,95 - 112.
B. Arrio, J. Chevallier, M. Jullien, J. Yon , and *R. Calvayrac* 78

III - Etude de l'hétérogénéité de la préparation par la méthode des cumulants.
1) Mode opératoire 96
2) Cas d'une suspension de sphères de latex 98
3) Cas d'une fraction de Reticulum Sarcoplasmique purifiée 101

IV - Conclusion 105

V - Références bibliographiques pour le chapitre V. 106

CONCLUSION GENERALE 107

CHAPITRE I

PRESENTATION THEORIQUE

Nous présentons dans ce chapitre les bases théoriques de la diffusion quasi élastique de la lumière et le principe de la technique utilisée pour son observation.

Cette présentation commence par un article ayant fait l'objet d'une communication à l'école d'été de Roscoff, intitulée "méthodes physiques en biologie", en juin 1974 ; cet exposé avait pour but d'initier les biologistes à une technique nouvelle pour eux et de leur montrer toutes les possibilités offertes dans le cadre de la biologie. Pour simplifier la présentation et faciliter la compréhension de l'article, aucun calcul n'était développé et il n'était question que d'analyse spectrale.

Au cours de notre travail nous avons utilisé un corrélateur à la place d'un analyseur de spectre, il nous a donc semblé nécessaire de compléter cet article par quelques notions élémentaires concernant la fonction de corrélation temporelle d'une fluctuation.

I - Article : Biochimie, 1975, 57, 429-436

Diffusion quasi-élastique de la lumière. Application à des problèmes biologiques.

Magali JULLIEN et Bernard ARRIO.
Laboratoire d'Enzymologie physico-chimique et moléculaire et Equipe de Recherche 118 du C.N.R.S., Institut de Biochimie, Université de Paris-Sud, 91405 — Orsay.

Summary. — The origin of the light scattered from macromolecular solutions is considered and a discussion is made around the use of laser and light beating spectroscopy to analyze the scattered field spectrum. Several experiments are reviewed where quasi elastic light scattering has been applied.

I — *Origine de la diffusion de la lumière.*

• *à l'échelle moléculaire.*

Le phénomène de diffusion de la lumière est un phénomène observé dans de nombreux domaines : diffusion par les molécules d'un gaz, diffusion par les molécules d'un liquide pur ou d'une solution, diffusion par les cristaux ; en particulier, la couleur bleue du ciel est due à la diffusion de la lumière solaire par les molécules de l'atmosphère.

La théorie électromagnétique de la lumière permet d'expliquer ce phénomène, d'origine moléculaire. En effet, considérons une molécule soumise au champ électrique $\vec{E}$ d'une onde électromagnétique ; sous l'action de ce champ, les charges positives de la molécule se déplacent dans un sens, alors que les charges négatives se déplacent dans le sens opposé, d'où l'apparition d'un dipôle induit dans la molécule, que l'on note :

$\vec{p} = \alpha\vec{E}$, α est la polarisabilité de la molécule.

Ce dipôle oscillant rayonne ; il est donc à l'origine d'un champ électrique diffusé dans tout l'espace.

Dans la réalité, on n'éclaire jamais une molécule isolée, mais un grand nombre de molécules, et ce que l'on observe, c'est la lumière diffusée par l'ensemble des dipôles induits dans toutes les molécules éclairées, c'est-à-dire le résultat des interférences entre toutes les ondes diffusées.

• *à l'échelle d'une solution.*

Considérons une solution homogène de molécules ; si les molécules étaient parfaitement immobiles, l'indice de réfraction de la solution serait homogène, et il n'y aurait pas de lumière diffusée : il serait toujours possible d'associer deux à deux les molécules de telle sorte que les ondes diffusées correspondantes soient en opposition de phase, donnant lieu à des interférences destructives.

En fait, si une solution homogène de molécules diffuse de la lumière, c'est parce qu'il règne à l'intérieur de la solution des hétérogénéités d'indice de réfraction ou fluctuations d'indice δn. Ces fluctuations peuvent avoir plusieurs origines : fluctuations de température, de pression, d'entropie ou de concentration [1]. Nous limiterons notre exposé aux fluctuations de concentration, qui donnent lieu à la diffusion appelée classiquement « diffusion Rayleigh ».

Il reste à examiner d'où proviennent ces fluctuations de concentration et comment elles agissent sur la lumière diffusée.

II — *Fluctuations de concentration.*

a) *Définition.*

Peut-être faudrait-il rappeler tout d'abord ce qu'est une fluctuation. Considérons une solution de concentration c et découpons par la pensée le volume occupé par la solution en volumes élémentaires. Isolons (toujours par la pensée) un de ces éléments de volume : à un certain instant t_1, il contient n_1 molécules, appelons c_1 la concentration correspondante. A l'instant $t_2 \neq t_1$, du fait de l'agitation thermique, un certain nombre de molécules seront sorties de l'élément alors que d'autres seront entrées et l'on aura n_2 molécules, d'où une concentration c_2. A l'instant t_i, on aura n_i molécules, à la concentration c_i. Si l'on fait la moyenne, sur un intervalle de temps assez grand, de toutes les concentrations c_i trouvées, on aura :

$$\overline{c_i} = c.$$

On écrira donc, qu'à l'instant t, la concentration dans l'élément de volume est :

$c(t) = c + \delta c(t)$, c étant la concentration moyenne et $\delta c(t)$ la partie fluctuante de cette concentration.

b) *Cas de la diffusion de translation.*

Quelle est l'origine de ces fluctuations ? Supposons, pour simplifier, que la solution contient un seul type de molécules ; si ces molécules sont sphériques et de dimensions petites devant la longueur d'onde de la lumière, le seul phénomène susceptible de provoquer une fluctuation de concentration est la diffusion de translation. Nous nous limiterons pour l'instant à ce cas.

Eclairons la solution avec une onde lumineuse de longueur d'onde λ_o et observons la lumière diffusée dans la direction Θ. On peut caractériser la lumière incidente par son vecteur d'onde $\vec{k}_o$, dirigé dans le sens de propagation de l'onde et de module :

$|\vec{k}_o| = \frac{2\pi n}{\lambda_o}$, n est l'indice de réfraction de la solution. On caractérisera, de même, la lumière diffusée par son vecteur d'onde $\vec{k}_d$:

$|\vec{k}_d| \neq |\vec{k}_o|$, car la vitesse de déplacement de la molécule est très petite devant la vitesse de la lumière. Il est d'usage de définir le vecteur d'onde :

$$\vec{K} = \vec{k}_d - \vec{k}_o \qquad \text{(fig. 1)}$$

$$|\vec{K}| = \frac{4\pi n}{\lambda_o} \sin \frac{\Theta}{2}$$

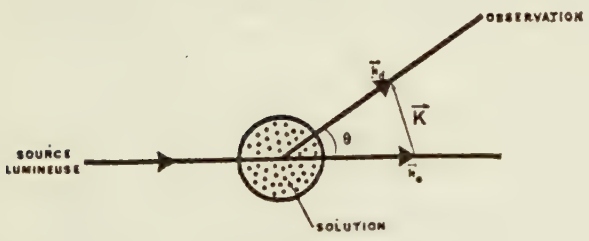


FIG. 1. — *Géométrie de la diffusion.*

Les seules fluctuations qui donneront une lumière diffusée dans la direction Θ sont les fluctuations de vecteur $\vec{K}$ qui, dans le cas de la diffusion de translation, peuvent s'écrire :

$$\delta c(\vec{K},t) = \delta c(\vec{K},o) e^{-K^2 D_T t}$$

$\delta c(\vec{K},o)$ est l'amplitude de la fluctuation et $\tau_R = (K^2 D_T)^{-1}$ la constante de temps ou durée de vie.

Considérons, par exemple, le cas du lysozyme, protéine globulaire de poids moléculaire P.M. = 14000 et de diamètre voisin de 50 Å ; en solution à pH 4,2, cette protéine a un coefficient du diffusion de translation de l'ordre de 11.10^{-7} cm²/s et la durée de vie d'une fluctuation de concentration est d'environ 20 µs pour un angle d'observation de 90°.

Dans la technique classique de la diffusion de la lumière, c'est l'amplitude de la fluctuation qui est étudiée, par l'intermédiaire de l'intensité diffusée. Dans le cas de la diffusion quasi-électrique de la lumière c'est la durée de vie qui est déterminée.

III — *Problème de la source lumineuse.*

a) *Sources conventionnelles.*

Les techniques utilisées avant 1967 pour l'étude de la diffusion Rayleigth ne permettaient pas une étude temporelle de cette fluctuation ; en effet, les

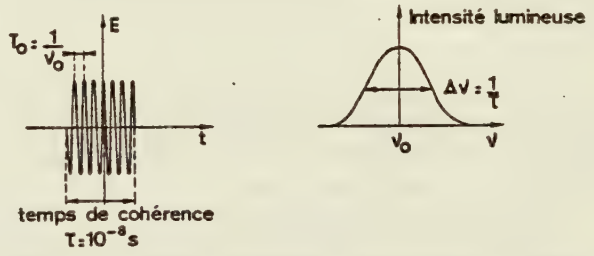


FIG. 2. — *Source lumineuse conventionnelle : variation temporelle et densité spectrale de la vibration.*

sources lumineuses utilisées, telles que l'arc au mercure, émettaient une lumière assez peu monochromatique.

On peut considérer la lumière émise par une source comme une succession de trains d'onde, sans cohérence de phase les uns avec les autres. La durée d'un train d'onde, ou temps de cohérence, pour une source lumineuse conventionnelle est de l'ordre de 10^{-8} s. On peut représenter schématiquement une telle source soit par la variation temporelle de la vibration correspondante, soit par son profil spectral (fig. 2). Comme nous avons vu que la durée de vie d'une fluctuation de concentration est de l'ordre de la micro-seconde, il n'était pas possible de la déceler si le temps de cohérence de l'onde lui était inférieur. La seule mesure possible était donc l'intensité de la lumière diffusée, qui est proportionnelle au carré moyen de l'amplitude de la fluctuation [2].

b) *Lasers.*

Par contre, l'apparition des lasers, sources beaucoup plus monochromatiques a permis d'envi-

sager l'étude de la relaxation temporelle de ces fluctuations. En effet, un laser émet des trains d'onde dont la durée peut être de 10^{-2} s ou plus (fig. 3) ; ce temps de cohérence est supérieur à la durée de vie d'une fluctuation et rend donc possible l'observation du phénomène.

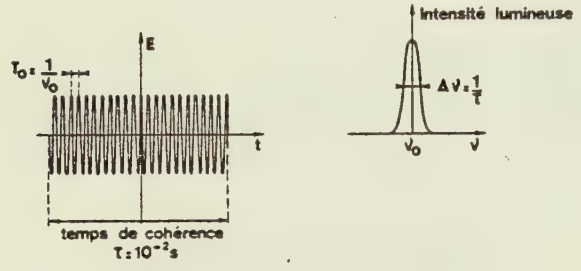


FIG. 3. — *Source LASER : variation temporelle et densité spectrale de la vibration.*

IV — *Spectre de la lumière diffusée.*

Eclairons une solution de macromolécules avec un laser. Le champ électrique de l'onde incidente :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \, e^{-j2\pi\nu_0 t},$$

va être modulé en amplitude et en phase par la fluctuation de concentration à l'intérieur de la solution :

$$\vec{E}_{\text{diffusé}}(t) = \delta\vec{E}(t) \, e^{-j2\pi\nu_0 t},$$

ce qui se traduira par un élargissement spectral (fig. 4).

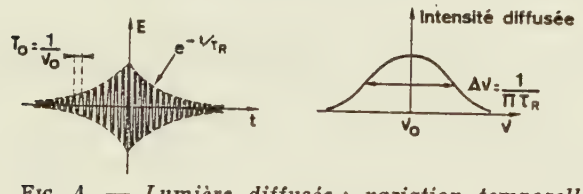


FIG. 4. — *Lumière diffusée : variation temporelle et densité spectrale de la vibration.*

Revenons à l'exemple du lysozyme ($\tau_R \simeq 20$ µs), la largeur du spectre (courbe Lorentzienne) de la lumière diffusée dans ce cas est :

$$\Delta\nu\,(I) = \frac{1}{\pi\,\tau_R} \simeq 10^4 \text{Hz}.$$

Il va se poser alors un nouveau problème : comment analyser ce spectre de largeur 10^4Hz, centré sur une fréquence optique $\nu_0 \simeq 5.10^{14}$ Hz. Il faut, pour analyser un tel spectre un pouvoir de résolution :

$$\frac{\nu_0}{\Delta\nu} \simeq 5.10^{10}.$$

Or, le meilleur spectromètre existant dans le domaine optique est l'interféromètre de Fabry-Perot, de pouvoir de résolution 10^7.

V — *Méthode spectroscopique : battements de photons.*

Par contre, résoudre une raie aussi fine est possible dans le domaine des basses fréquences (ondes radio). Le but de la technique spectroscopique des battements de photons [3, 4, 5] a donc été de déplacer la fréquence centrale ν_0 de l'onde porteuse vers les basses fréquences, plus précisement $\nu = 0$ pour pouvoir analyser le spectre avec les analyseurs d'onde radio habituels.

Le principe en est le suivant : la lumière diffusée, composée de toutes les fréquences du spectre, éclaire la photocathode d'un photomultiplicateur, sensible à l'intensité lumineuse. Sélectionnons deux fréquences particulières ν_1 et ν_2 ; il se produit un phénomène de battements entre ces ondes de fréquences voisines, qui se traduit par l'apparition des fréquences $\nu_1 + \nu_2$ et $\nu_2 - \nu_1$, d'ordres de grandeur très différents (fig. 5) ; $\nu_2 - \nu_1$ est du domaine des basses fréquences ($< 10^5$ Hz dans le cas du lysozyme), $\nu_1 + \nu_2$ du domaine des fréquences optiques. Le temps de réponse du photomultiplicateur est tel que seul le spectre des basses fréquences apparaît dans le spectre du photocourant (fig. 6). Et la mesure de la largeur :

$$\Delta\nu\,(i) = \frac{2}{\pi\,\tau_R}$$

de ce spectre permettra de déduire la durée de vie τ_R de la fluctuation.

Laser et photomultiplicateur constituent les éléments essentiels pour l'étude de durées de vie de fluctuations de concentration qui sont de l'ordre de la microseconde ou plus. On peut donc représenter schématiquement la réalisation d'une expé-

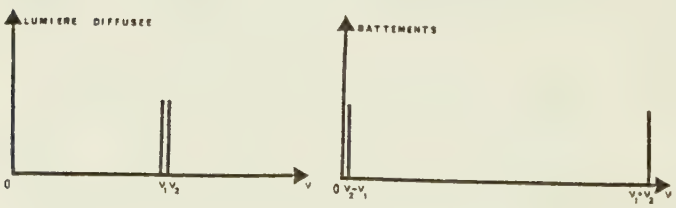


FIG. 5. — *Phénomène de battements entre les différentes fréquences constituants la lumière diffusée.*

rience de diffusion quasi-élastique de la lumière (fig. 7).

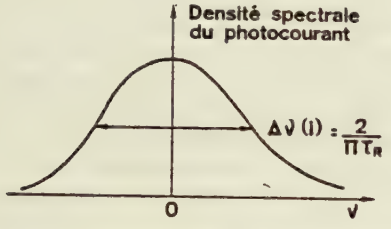


FIG. 6. — *Photocourant : densité spectrale.*

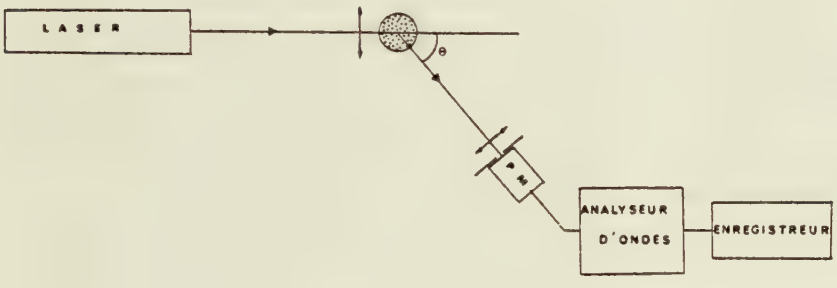


FIG. 7. — *Schéma du dispositif expérimental.*

VI — *Analyse des résultats.*

Une certaine méthodologie s'impose dans la conduite de l'expérimentation pour une interprétation non ambiguë des résultats. Le premier type d'expérience effectué sur une solution x conduit à mesurer la largeur à mi-hauteur du spectre du photocourant pour un angle d'observation de 90°. A ce moment, il importe d'étudier la dépendance angulaire, c'est-à-dire la dépendance de la largeur du spectre en fonction de l'angle d'observation. En effet, deux cas principaux peuvent se présenter, schématisés sur la figure 8. Le premier cas correspond à une solution homogène de molécules (sphériques ou non sphériques) de dimensions petites devant la longueur d'onde de la lumière incidente λ_0 ; auquel cas, la diffusion de translation est le seul phénomène observable dans l'élargissement spectral. Dans le deuxième cas, un ou plusieurs phénomènes non négligeables viennent se superposer à la diffusion de translation entrainant une augmentation de l'élargissement spectral ; si les molécules sont dissymétriques et de dimensions voisines de λ_0 (forme de bâtonnet par exemple), ce peut être la diffusion de rotation [7] ou des mouvements de déformation interne de la molécule [8, 9] ; si deux espèces de molécules de polarisabilités différentes sont en équilibre chimique, ce peut être le temps de relaxation des fluctuations de concentration autour des concentrations d'équilibre [10-14]. Ces divers phénomènes provoquant des élargissements indépendants de l'angle d'observation. L'étude de la dépendance angulaire permet donc de mettre en évidence l'existence éventuelle des différents effets [15].

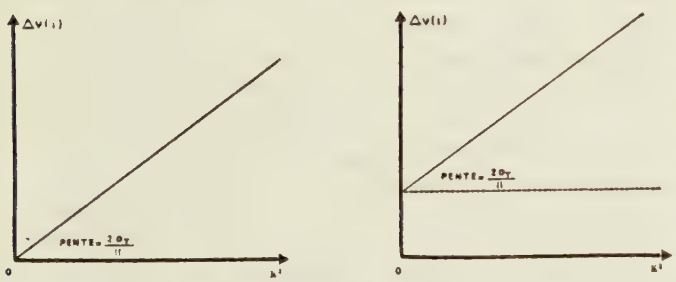


FIG. 8. — *Variations possibles de la largeur spectrale du photocourant en fonction de K^2.*

VII — *Applications.*

Depuis quelques années, on a cherché à appliquer la méthode de diffusion quasi élastique de la lumière à l'étude de macromolécules ou de particules biologiques. L'utilisation la plus fréquente de la méthode a été la mesure des coefficients de diffusion de translation, soit de virus, soit de vésicules membranaires (microsomes de foie, reticulum sarcoplasmique), soit de protéines. La méthode consiste alors à déterminer la taille des particules ou des molécules. En outre la diffusion quasi élastique de la lumière ne se limite pas à cette seule détermination. Certains travaux utilisant la mesure des coefficients de diffusion de translation ont cherché à résoudre le problème des mécanismes de dénaturation des protéines, en particulier à préciser s'il s'agit d'un phénomène à deux ou à plusieurs états. De plus en plus on relève dans la littérature des travaux qui tentent d'utiliser les mesures des fluctuations de la lumière diffusée comme méthode de relaxation. Enfin, l'application à des mouvements de microorganismes fait l'objet de quelques travaux.

A — *Mesure des coefficients de diffusion de translation.*

Les premiers utilisateurs de la diffusion quasi élastique de la lumière en biologie sont les virologistes et cela n'est pas fortuit. En effet il est essentiel de pouvoir caractériser une particule virale par sa masse moléculaire ou une dimension. Or les méthodes telles que l'ultracentrifugation, la pression osmotique, ou même la diffusion de la lumière sont difficilement utilisables pour déterminer des masses moléculaires allant de $45\,10^6$ pour le phage λ jusqu'à $192\,10^6$ pour le phage T_4. De même les techniques classiques de mesure du coefficient de diffusion de translation demandent plusieurs jours pour obtenir une valeur de ce coefficient. Des travaux préliminaires sur des suspensions de sphères de latex de diamètres connus ont permis de vérifier la relation de proportionnalité entre la largeur à mi-hauteur du spectre de la lumière diffusée et le coefficient de diffusion de translation [16, 18]

$$\Delta\nu = \frac{K^2 D_T}{\pi}$$

et de mesurer le diamètre des sphères de polystyrène sachant que :

$$D_T = \frac{k\,T}{3\,\pi\,\eta\,d}$$

où k est la constante de Boltzmann
T : la température absolue
η : la viscosité du milieu
d : le diamètre.

Il faut souligner que la précision sur les mesures de D_T est de l'ordre de 1 p. cent et que l'incertitude qui apparaît dans la détermination des masses moléculaires des virus vient des erreurs sur la mesure du volume partiel spécifique $\bar{v}$ de ces particules. Dans la plupart des cas, la combinaison d'une mesure de la vitesse de sedimentation avec une mesure de D_T donne la masse moléculaire des virus avec une bonne précision (de l'ordre de 4 à 6 p. cent) à partir de la relation bien connue :

$$M = \frac{S}{D_T}\,\frac{RT}{(1 - \rho\bar{v})}$$

dans laquelle M est la masse moléculaire, S la vitesse de sédimentation, D_T le coefficient de diffusion de translation, ρ la densité du solvant et $\bar{v}$ le volume partiel spécifique de la particule [18-25]. Nous avons admis tacitement dans ce qui précède une diffusion isotrope de la lumière par les particules virales. Or l'étude au microscope électronique de nombreux phages tels que T_4, T_5, λ, etc a montré que ces particules avaient une forme très disymétrique. Par conséquent les fluctuations de l'intensité diffusée vont être modulées par les fluctuations d'orientation. L'étude de la distribution spectrale de la lumière diffusée par des suspensions de V MT à différents angles ont permis à Dubin *et al.* [18], Cummins *et al.* [20] Wada *et al.* [23] de mesurer le coefficient de diffusion de rotation de ce virus. De plus Schaeffer *et al.* [21] ont pu montrer que l'anisotropie du coefficient de diffusion de translation affecte l'allure des spectres de la lumière diffusée par le V MT.

La précision et la qualité des résultats obtenus avec les particules virales ont contribué au développement de travaux sur les membranes. En effet, la description de l'homogénéité d'une préparation de vésicules membranaires, la connaissance du diamètre de ces vésicules sont des éléments d'information extrêmement importants en particulier lorsque des expériences de reconstitution membranaire sont envisagées. Jusqu'à présent ce type d'information n'était obtenu que par des observations au microscope électronique, l'apport de la diffusion quasi électrique de la lumière est de pouvoir obtenir ces renseignements dans des conditions identiques à celles où l'on mesure les activités de ces membranes.

Ainsi, Holtzman *et al.* [26] ont pu déterminer la taille des sous particules renfermant l'activité cytochrome réductase des microsomes de foie traités par un détergent. De même Arrio *et al.* ont fait une étude comparative des dimensions de vésicules de reticulum sarcoplasmique obtenues par diffusion quasi élastique de la lumière et par microscopie électronique. Cette étude a permis de montrer les limites de la description de l'hétérogénéité d'une préparation membranaire par diffusion quasi électrique de la lumière.

Dans la gamme opposée des tailles macromoléculaires, cette technique a permis de mesurer le coefficient de diffusion de translation d'un certain nombre de protéines (ribonucléase, serum albumine bovine, lysozyme, hemocyanine etc.) [27-34].

L'extension des mesures de coefficient de diffusion [33, 39] au traitement des problèmes de conformation des protéines en solution est d'ores et déjà réalisée. Ainsi Dubin *et al.* [33] ont étudié le mécanisme de la dénaturation du lysozyme par la guanidine. Le coefficient de diffusion de translation du lysozyme natif est de $10{,}6 \pm 0{,}1\ 10^{-7}$ cm²/s et de $7{,}3 \pm 0{,}1\ 10^{-7}$ cm²/s pour le lysozyme dans la guanidine 6 M. Les auteurs ont essayé de mettre en évidence pour chaque concentration de guanidine, la présence de deux contributions dans le spectre de la lumière diffusée, l'une due au lysozyme natif, l'autre au lysozyme dénaturé. En fait, les spectres obtenus à chaque concentration de

guanidine sont parfaitement lorentziens donc le mécanisme de la dénaturation du lysozyme pourrait s'interpréter par un déplissement progressif de la molécule. L'analyse théorique de ce problème a permis aux auteurs de mettre en évidence une limitation sévère de la méthode qui ne peut distinguer entre deux espèces moléculaires dont le rapport des coefficients de diffusion de translation est inférieur à 3. Par conséquent la diffusion quasi élastique de la lumière n'a pu trancher dans le cas du lysozyme entre un mécanisme de dénaturation continu ou discontinu.

B — *Flexibilité des macromolécules.*

Nous avons vu précédemment que d'autres phénomènes que la translation peuvent moduler les fluctuations de la lumière diffusée. En particulier les mouvements de flexion d'une protéine en forme de filament peuvent contribuer à l'élargissement du spectre de la lumière diffusée. Ce type de mouvements a été mis en évidence sur l'actine F en solution par Fujime *et al.* [36]. Les spectres enregistrés entre 40° et 150° sont de simples lorentziennes de largeur :

$$\Delta\nu\,(I) = \frac{1}{\pi}\left(K^2 D_T + \frac{1}{\tau}\right)$$

où

$$\frac{1}{\tau} = \frac{<N>}{\tau_1}$$

avec N : principal mode de relaxation

τ_1 : temps de relaxation du 1er mode.

Le temps de relaxation trouvé pour le mode le plus lent est de $5\,10^{-3}$ s et une distance moyenne de 2,3 µ entre les deux extrémités du filament d'actine. A partir de ce résultat Fujime et Ishiwata [37, 38] ont étendu cette mesure de flexibilité aux complexes formés par l'actine avec la meromyosine lourde et la tropomyosine.

La formation du complexe F actine meromyosine lourde augmente la flexibilité du filament d'actine. Le maximum de flexibilité est atteint pour un rapport Actine/Meromyosine = 6. Par contre la formation du complexe Actine tropomyosine diminue la flexibilité de l'actine. Finalement, les mêmes auteurs ont étudié l'effet des ions Ca^{2+} sur la flexibilité d'un filament fin reconstitué, c'est-à-dire un complexe Factine, tropomyosine, troponine. Alors que dans les autres complexes le coefficient de diffusion de translation de l'actine n'était pas modifié, l'addition de troponine le diminue. L'addition de Ca^{++} (10^{-6} M) à ce complexe provoque l'augmentation réversible de la flexibilité de l'actine.

Pour de plus fortes concentrations de Ca^{++} (20.10^{-6} M) on observe la formation réversible d'un gel d'Actine. La variation de flexibilité observée pour des concentrations de Ca^{++} de l'ordre de 10^{-6} M sont en accord avec les données physiologiques. La formation du gel pour les plus fortes concentrations de Ca^{2+} (20 µM) n'a rien à voir avec le mécanisme de la contraction musculaire. Par contre ce type de réaction :

$$n \text{ filaments dispersés} \underset{\longleftarrow}{\overset{M^{++}}{\longrightarrow}} \text{Gel}$$

peut être un excellent modèle d'étude des mouvements de certains microorganismes.

C — *Mouvements de microorganismes.*

Puisque la diffusion quasi élastique de la lumière est liée aux fluctuations de concentration il est évident que toute particule animée d'un mouvement quelconque donnera un spectre caractéristique de diffusion.

Bergé *et al.* [40, 41] ont montré que la vitalité des spermatozoïdes de lapins peut se caractériser par les différences de largeur de raie caractérisant la diffusion des spermatozoïdes vivants et morts. D'autres problèmes tels que le chimiotactisme des bactéries a été abordé par Nossal *et al.* [42-44] en étudiant la distribution des vitesses de bactéries (*E. coli* K_{12}) en réponse à un gradient d'oxygène.

D — *La DQEL comme méthode de relaxation.*

Ce dernier aspect de la méthode est le plus récent. La première expérience, utilisant les fluctuations de polarisabilité de deux espèces moléculaires en équilibre afin de déterminer les constantes de vitesse directe et reverse est due à Yeh [12]. La réaction étudiée était la dissociation du sulfate de manganèse. Plus récemment le même auteur [45] a déterminé les constantes de vitesse de la transition alcaline reversible du deoxyadenylate-deoxythymidylate. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus par « T-Jump ». Un autre exemple nous permettra d'illustrer l'intérêt de cette application : l'équilibre de dissociation tétramère dimère de l'hémoglobine dont l'étude est due à Uzgiris *et al.* [46]. La molécule d'hémoglobine humaine est un tétramère constitué de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β qui peut se dissocier suivant la réaction :

$$\alpha_2\,\beta_2 \underset{kd}{\overset{kr}{\rightleftharpoons}} 2\,\alpha\,\beta$$

La constante d'équilibre K est :

$$K = \frac{C_2^2}{C_4} = \frac{kd}{k_r}$$

C_4 et C_2 sont les concentrations du tétramère et du dimère.

Pour différentes concentrations d'hémoglobine et différents angles d'observation on a la relation :

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi}(K^2 D_T + \frac{1}{\tau}) \qquad (1)$$

où $1/\tau$ représente le temps de relaxation de l'équilibre tétramère dimère.

$$\frac{1}{\tau} = kd + 4\, k_r\, C_2 \qquad (2)$$

$$\text{avec } C_2 = \frac{K}{4}\left[-1 + (1 + \frac{16\, C}{K})^{1/2}\right] \qquad (3)$$

En remplaçant C_2 par sa valeur dans la relation (2) il vient :

$$(\frac{1}{\tau})^2 = k_d\,(1 + \frac{16\, C}{K})$$

Donc connaissant K et la dépendance de $(\frac{1}{\tau})^2$ en fonction de la concentration d'hémoglobine on peut déterminer k_d et également k_r.

Il s'agit là d'une application extrêmement importante de la méthode qui deviendra ainsi le complément des autres méthodes de relaxation.

VIII — *Conclusion.*

La diffusion quasi-élastique de la lumière, qui doit son développement à l'introduction des lasers, est donc une méthode qui permet d'atteindre la durée de vie de fluctuations de concentration des particules ou de molécules ; c'est en cela qu'elle se distingue par son principe de la méthode classique de diffusion de la lumière qui étudie l'amplitude des fluctuations.

Le temps de relaxation déterminé par diffusion quasi-élastique de la lumière peut dépendre de la diffusion de translation, de la diffusion de rotation ou de mouvements propres de la molécule. Si deux espèces de molécules de polarisabilités différentes sont en équilibre chimique, le temps de relaxation dépendra des fluctuations de concentration autour de l'équilibre ; dans ce cas la méthode de diffusion quasi-élastique de la lumière peut être utilisée comme méthode de relaxation, tout comme la relaxation thermique lorsque la variation d'enthalpie est différente de zéro.

Les avantages de la méthode sont la rapidité d'acquisition des données et la possibilité d'étudier les molécules ou les particules en solution, sans perturbation extérieure.

De plus en plus, la diffusion quasi-élastique de la lumière est appliquée à l'étude de particules ou de molécules biologiques. Elle a permis de mesurer les coefficients de diffusion de translation de protéines, de virus et de vésicules membranaires. Elle a été appliquée à l'étude du mécanisme de repliement des protéines. Pour l'approche de ces divers problèmes, la méthode présente des avantages indiscutables, mais comporte aussi certaines limitations qui sont discutées dans le texte.

Un très bel exemple d'application de cette méthode est fourni par l'étude de la flexibilité des filaments d'actine libre ou complexée.

Bien qu'elle ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude des équilibres chimiques, la diffusion quasi-élastique de la lumière comme méthode de relaxation connait encore assez peu d'applications dans le domaine biologique. Ceci tient tout d'abord au fait que ce dernier aspect de la méthode est plus récent. D'autre part, il faut trouver un système adéquat, la condition nécessaire étant la différence de polarisabilité des espèces en équilibre. Quoi qu'il en soit actuellement, cet aspect extrêmement important de la méthode subira sans aucun doute des développements dans le domaine qui nous intéresse et constituera une méthode complémentaire des autres méthodes de relaxation.

Les perspectives d'application de ce genre de technique sont nombreuses ; elles ne se limitent pas seulement à l'étude des fluctuations de l'intensité diffusée ; on peut outre envisager d'observer les fluctuations d'un autre paramètre qui reflète la concentration d'un des constituants de la solution, par exemple : l'absorption, la fluorescence, la résistivité électrique, la diffusion Raman etc... [47, 48].

Résumé.

Après un bref rappel sur l'origine de la lumière diffusée par les solutions, on montre comment l'apparition des lasers et la technique des battements de photons ont permis l'analyse spectrale de la lumière diffusée. Une série d'exemples permet de voir les divers domaines d'application de la diffusion quasi-élastique de la lumière.

Remerciements.

Les auteurs remercient vivement Mademoiselle Jeanine Yon pour ses critiques et ses conseils.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Candau, S. (1969) *Ann. Phys.*, 4, 21-54.
2. Tanford, C. (1961) *Physical Chemistry of macromolecules*, Chapter 5. John Wiley and Sons.
3. Forrester, A. T. (1961) *J. Opt. Soc. Am.*, 51, 253.
4. Bergé, P. (1967) *Bull. Soc. Fr. Mineral Cristallogr.*, XC, 508-516.
5. Benedek, G. B. (1969) *Polarisation matière et rayonnement*, volume jubilaire en l'honneur d'Alfred Kastler, 49-84.

6. Cummins, H. Z., Swinney, H. L. (1970) *Progress in optics*, vol. VIII, 135-200. E. Wolf, North Holland, Amsterdam.
7. Pecora, R. (1968) *J. Chem. Phys.*, 48, 4126-4128.
8. Pecora, R. (1968) *J. Chem. Phys.*, 49, 1032-1035.
9. Fujime, S. Maruyama, M. (1973) *Macromolecules*, 6, 237-241.
10. Berne, B. J. (1967) *J. Chem. Phys.*, 47, 3675-3676.
11. Blum, L., Slasburg, Z. W. (1968) *J. Chem. Phys.*, 48, 2292-2309.
12. Yeh, Y., Keeler, R. N. (1969) *Quart. Rev. Biophys.*, 2, 315-349.
13. Blum, L., Salsburg, Z. W. (1969) *J. Chem. Phys.*, 50, 1654-1660.
14. Fujime, S. (1973) *Macromolecules*, 6, 361-366.
15. Dubin, S. B. (1972) *Methods Enzymol.*, 26, 119-174.
16. Dunning, J. W., Angus, J. C. (1968) *J. Appl. Phys.*, 39, 2479.
17. Thompson, D. S. (1971) *J. Chem. Phys.*, 54, 1411-1412.
18. Dubin, S. B., Benedek, G. B., Bancroft, F. C., Freifelder, D. (1970) *J. Mol. Biol.*, 54, 547-556.
19. French, M. J., Angus, J. C., Walton, A. G. (1969) *Science*, 163, 345-351.
20. Cummins, H. Z., Carlson, F. D., Herbert, T. J., Woods, G. (1969) *Biophys. J.*, 9, 518-546.
21. Schaefer, D. W., Benedek, G. B., Schoffield, P., Bradford, E. (1971) *J. Chem. Phys.*, 55, 3884-3892.
22. Pusey, P. N., Schaeffer, D. W., Koppel, D. E., Camerini-Otero, R. D., Franklin, R. M. (1972) *J. Phys.*, 33, C, 163-168.
23. Wada, A., Suda, N., Tsuda, T., Soda, K. (1969) *J. Chem. Phys.*, 50, 31-35.
24. Salmeen, I., Gill, D., Rimaï, L. (1972) *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 5, 1172-1178.
25. Pusey, P. N., Koppel, D. E., Schaeffer, D. W., Camerini-Otero, R. O., Koenig, S. H. (1974) *Biochem.*, 13, 957-970.
26. Holtzman, D. (1972) *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 27, 325-330.
27. Rimaï, L., Hickmott, J. T., Cole, J. R. T., Carew, E. B. (1970) *Biophys. J.*, 10, 20-37.
28. Wilson, W. W., Johnson, C. S. (1972) *J. Phys. Chem.*, 76, 2744-2749.
29. Dubin, S. B., Lunacek, J. H., Benedek, G. B. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 57, 1164-1171.
30. Dubin, S. B., Clark, N. A., Benedek, G. B. (1971) *J. Chem. Phys.*, 54, 5158-5166.
31. Wood, E. J., Bannister, W. H., Oliver, C. J., Lontie, R., Witters, R. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.*, 40 B, 19-24.
32. Foord, R., Jackeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E. Peacoche A. R. (1970) *Nature*, 227, 242-245.
33. Dubin, S. B., Feher, G., Benedek, G. B. (1973) *Biochem.*, 12, 714-719.
34. Arnaud, B., Legré, J., Drifford, M. (1974) *J. Chimie Phys.*, 71, 591-596.
35. Hanson, J., Lowy, J. (1963) *J. Mol. Biol.*, 6, 46-60.
36. Fujime, S. (1970) *J. Phys. Soc. Jap.*, 29, 751-771.
37. Fujime, S., Ishiwata, S. (1971) *J. Mol. Biol.*, 62, 251-265.
38. Ishiwata, S., Fujime, S. (1972) *J. Mol. Biol.*, 68, 511-522.
39. Herbert, T. J., Carlson, F. D. (1971) *Biopolymers*, 10, 2231-2252.
40. Bergé, P., Volochine, B., Billard, R., Hamelin, A. (1967) *C. R. Acad. Sc.*, série D, 265, 889-892.
41. Adam, M., Hamelin, A., Bergé, P., Goffaux, M. (1969) *Biol. anim. Biochem. Biophys.*, 9, 651-655.
42. Nossal, R. (1971) *Biophys. J.*, 11, 341-354.
43. Nossal, R., Chen, S. H., Lai, C. C. (1971) *Opt. Comm.*, 4, 35-39.
44. Nossal, R., Chen, S. H. (1972) *Opt. Comm.*, 5, 117-122.
45. Yeh, Y. (1970) *J. Chem. Phys.*, 52, 6218-6225.
46. Uzgiris, E. E., Golibersuch, D. C. (1974) *Phys. Rev. Letters*, 32, 37-40.
47. Berne, B. J. (1973) *Accounts of Chemical Research*, 6, 318-322.
48. Magde, D., Elson, E., Webb, W. W. (1972) *Phys. Rev. Lett.*, 29, 705-707.

Imprimerie Declume — Lons-le-Saunier.

A l'époque où cet article fut écrit (mars 1974), diverses applications de la diffusion quasi élastique de la lumière (D.Q.E.L.) avaient été tentées. Nous citerons la détermination des coefficients de diffusion de translation et de rotation d'un certain nombre de virus et de protéines, les études de flexibilité des filaments d'actine F libre et complexée et les études de mouvements de microorganismes. Une publication récente d'Uzgiris et Golibersuch (1974) attribuant une partie des fluctuations de l'intensité diffusée par une solution d'hémoglobine à la réaction tétramère-dimère laissait entrevoir la possibilité d'utiliser la D.Q.E.L. comme méthode de relaxation. Signalons que ces derniers résultats ont été contestés depuis et attribués à l'absorption de la méthémoglobine (Haas et al., 1974).

Depuis 1974, les études par D.Q.E.L. de conformations de protéines et de systèmes plus complexes se sont considérablement accrues. Il faut signaler plus particulièrement la mise au point d'une technique différentielle qui a permis de mesurer une diminution de 4% du coefficient de diffusion de translation de l'aspartate transcarbamylase en présence de succinate et de carbamyl phosphate (Dubin, Cannell, 1975).

Actuellement, la possibilité d'utiliser la D.Q.E.L. comme méthode de relaxation est de moins en moins envisagée. Par contre, le développement d'une nouvelle méthode spectroscopique basée sur l'observation non pas des fluctuations de l'intensité diffusée mais des fluctuations de la fluorescence présente un grand intérêt. La technique a déjà été appliquée avec succès à l'étude des constantes cinétiques de l'équilibre A.D.N.-Bromure d'Ethidium et à la mesure du coefficient de diffusion de translation de la rhodamine (Magde et al., 1974). Elle est maintenant utilisée pour l'étude des mouvements de diffusion dans les membranes (Elson, Webb, 1975). La spectroscopie de corrélation de fluorescence semble être une technique de choix dans le cas de concentrations faibles ou de molécules de petite taille.

II - Introduction aux fonctions de corrélation

Ce paragraphe est une présentation du formalisme mathématique et des notations utilisées par la suite. C'est une introduction aux propriétés statistiques d'une grandeur qui fluctue et aux propriétés du champ diffusé qui lui est associé.

1) Propriétés statistiques d'une fluctuation

Considérons une grandeur physique caractérisant un certain corps en équilibre thermodynamique. Cette grandeur subit dans le temps de petites variations en fluctuant autour de sa valeur moyenne. Soit $x(t)$ la différence entre cette grandeur et sa valeur moyenne. Entre les valeurs de $x(t)$ aux

divers instants, il y a une certaine corrélation ; ceci veut dire que la valeur de x à un certain instant t influe sur la probabilité de ses diverses valeurs à un autre instant t + τ. On peut caractériser la corrélation temporelle par la valeur moyenne du produit x(t). x(t + τ) notée :

$$\phi(\tau) = \langle x(t).\, x(t+\tau) \rangle = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t).\, x(t+\tau)\, dt,$$

T étant un intervalle de temps.

Si le processus est stationnaire :

$$\langle x(t).\, x(t+\tau) \rangle = \langle x(0).\, x(\tau) \rangle.$$

Pour un phénomène entièrement au hasard, toute mémoire disparait lorsque le retard τ devient grand, soit :

$$\lim_{\tau\to\infty} \langle x(0).\, x(\tau) \rangle = 0.$$

D'autre part, quand τ tend vers zéro :

$$\lim_{\tau\to 0} \langle x(0).\, x(\tau) \rangle = \langle x^2 \rangle.$$

On peut alors définir la fonction d'autocorrélation normalisée :

$$\frac{\langle x(0).\, x(\tau) \rangle}{\langle x^2 \rangle}$$

Une fonction telle que x(t) peut être développée en série de Fourier dans l'intervalle $\left[-\frac{T}{2}, +\frac{T}{2} \right]$; on aboutit ainsi au théorème de Wiener-Khintchine (Kittel, 1958), qui relie la densité spectrale à la fonction d'autocorrélation :

$$s(\omega) = \lim_{T\to\infty} \left[\frac{1}{T} \left| \int_{-T/2}^{T/2} x(t)\, e^{-j\omega t}\, dt \right|^2 \right] = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \phi(\tau)\, e^{-j\omega\tau}\, d\tau.$$

La densité spectrale et la fonction d'autocorrélation sont réciproques dans une transformation de Fourier. Si, par exemple, x(t) a un spectre de densité s(ω) Lorentzien de demi-largeur à mi-hauteur Γ, la fonction d'autocorrélation est une exponentielle de constante de temps le temps de corrélation $\tau_c = \Gamma^{-1}$.

2) Propriétés statistiques du champ diffusé et du photocourant correspondant

Il a été mentionné dans l'article que ce sont les fluctuations de la constante diélectrique du milieu qui modulent le champ électrique de l'onde diffusée ; $\vec{E}_d(t)$ est donc une grandeur aléatoire, dont on peut définir la fonction d'autocorrélation du 1er ordre, normalisée :

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{< E_d^*(t)\ E_d(t+\tau) >}{< |\ E_d(t)\ |^2 >} \quad ,$$

dont la valeur est : $e^{-j\,2\pi\,\nu_o\tau}\ e^{-\tau/\tau_R}$

si τ_R est le temps de relaxation de la fluctuation, ν_o la fréquence de l'onde incidente (E_d^* est la valeur complexe conjuguée de E_d).

Le photomultiplicateur n'est sensible qu'à l'énergie lumineuse, c'est-à-dire au carré du champ électrique instantané de l'onde lumineuse arrivant sur la cathode, soit :

$I(t) = E_d^*(t).\ E_d(t)$, en un point de la photocathode. Le photocourant correspondant est :

$i(t) = 6\ .\ I(t)$, où 6 est un coefficient qui traduit à la fois le rendement quantique de la photocathode et le gain du photomultiplicateur (En fait, la lumière diffusée éclaire non pas un point mais une certaine surface A de la photocathode et le courant est proportionnel au flux lumineux intégré sur A).

La fonction d'autocorrélation du courant photoélectrique s'écrit (C H U, 1974) :

$$C(\tau) = < i(t)\ i(t+\tau) > = e < i > \delta(\tau) + < i >^2 g^{(2)}(\tau),$$

où $g^{(2)}(\tau)$ est la fonction d'autocorrélation du second ordre normalisée du champ électrique :

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{< E_d^*(t)\ E_d(t)\ E_d^*(t+\tau)\ E_d(t+\tau) >}{< E_d^*\ E_d >^2} \quad ,$$

$\delta(\tau)$ la fonction de Dirac, e la charge de l'électron.

Si le nombre de molécules dans le volume diffusant est suffisamment grand, la distribution de probabilité du signal est une distribution gaussienne, et on a la relation de Siegert :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + |g^{(1)}(\tau)|^2$$

La fonction d'autocorrélation du photocourant correspondant à une fluctuation de concentration est alors reliée à la constante de temps τ_R de la fluctuation par la relation :

$$C(\tau) = e \langle i \rangle \delta(\tau) + \langle i \rangle^2 \left[1 + e^{-2\tau/\tau_R} \right]$$

III - Références bibliographiques pour le chapitre I*

CHU, B. (1974) - Laser Light Scattering, Academic Press.

DUBIN, S.B., et CANNELL, D.S. (1975), - Biochemistry 14, 192-195.

ELSON, E.L. et WEBB, W.W. (1975), - Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 311-334.

HAAS, D.D., MUSTACICH, R.V. SMITH, B.A. et WARE, B.R. (1974), - Biochem. Biophys. Research Comm. 59, 174-180.

KITTEL, C. (1958) Elementary Statistical Physics - John Wiley and Sons p. 133.

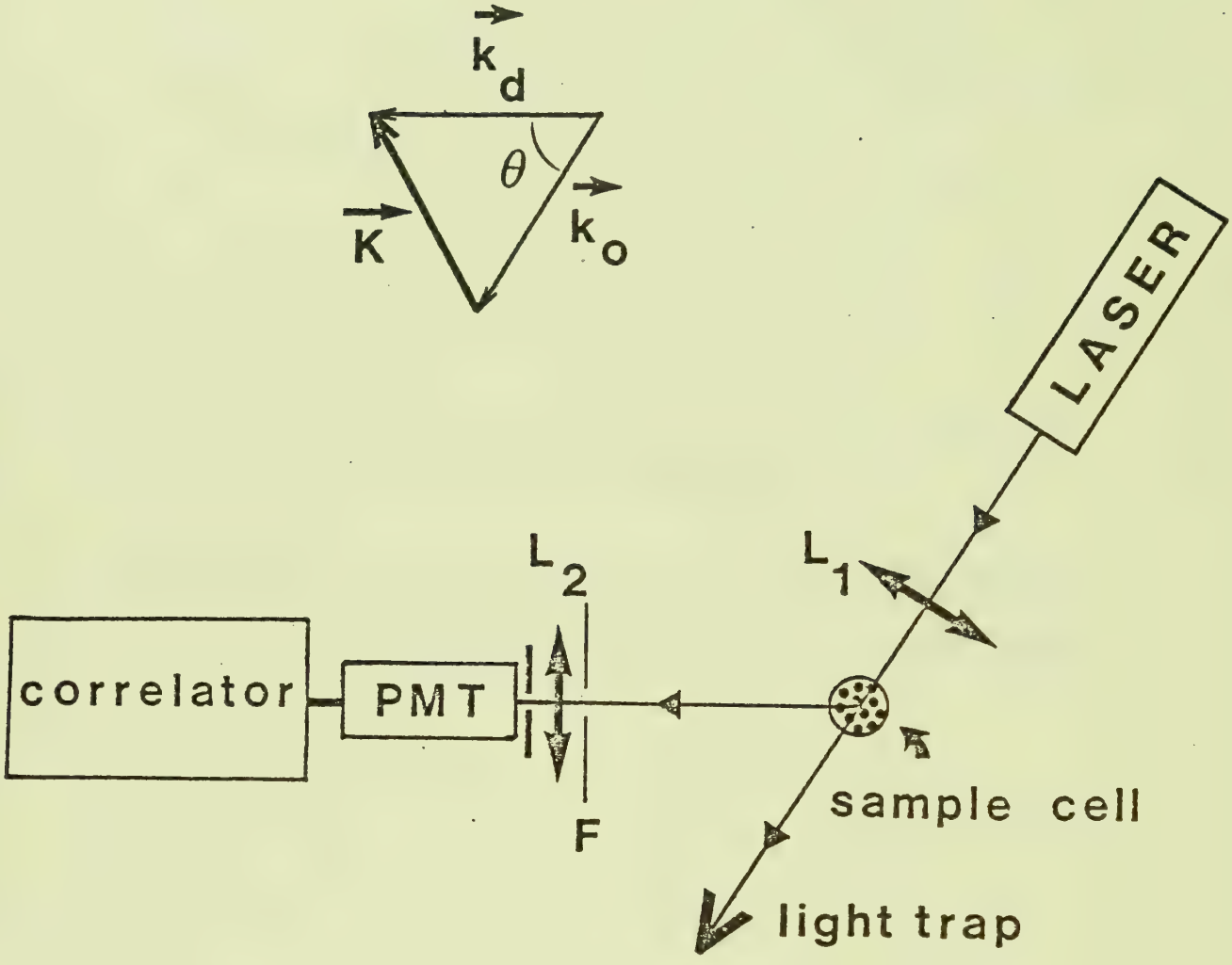
MAGDE, D., ELSON, E.L. et WEBB, W.W. (1974), - Biopolymers 13, 29-61

UZGIRIS, E.E. et GOLIBERSUCH, D.C. (1974), - Phys. Rev. Lett. 32, 37-40

* Ces références ne concernent que les compléments à l'article.

CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UN DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR L'OBSERVATION DE LA DIFFUSION QUASI ELASTIQUE DE LA LUMIERE EN BIOLOGIE



Chapitre II - Figure 1 - Dispositif expérimental

L_1 : lentille convergente (f = 13,3 cm)
L_2 : lentille convergente (f = 5 cm)
PMT : photomultiplicateur
F : fente réglable

I - Description générale du dispositif expérimental

Le principe de la réalisation expérimentale est le suivant : le faisceau lumineux émis par le laser est focalisé par l'intermédiaire d'une lentille convergente sur l'échantillon contenu soit dans une cuve carrée, soit dans une cuve cylindrique ; la lumière diffusée sous l'angle θ est reçue dans un certain angle solide par l'intermédiaire d'une fente réglable et focalisée sur un petit diaphragme placé devant la photocathode d'un photomultiplicateur utilisé comme compteur de photons. Les signaux sont ensuite amplifiés et mis en forme avant d'être analysés temporellement par un corrélateur digital ; un fréquencemètre, placé en parallèle à la sortie de l'amplificateur, permet de contrôler et de mesurer éventuellement l'intensité diffusée (figure 1).

II - Caractéristiques des divers éléments

1) La source lumineuse : laser Hélium-Néon

La source lumineuse est un laser à gaz Hélium-Néon. Un laser à gaz est constitué d'un tube rempli d'un gaz ou d'un mélange de gaz (ici, 90% d'Hélium et 10% de Néon) excité par une décharge électrique et placé à l'intérieur d'un résonateur optique du type Perot-Fabry. Si un certain nombre de conditions sont réalisées, le milieu constitué par le gaz ionisé peut devenir amplificateur de lumière, c'est-à-dire que certaines raies spectrales qui le traversent se trouvent considérablement amplifiées et affinées. Ce rétrécissement est d'autant plus important que l'amplification est importante, donc que le laser est plus puissant (dans tous les cas $\Delta\nu_{laser} << 1$ Hz).

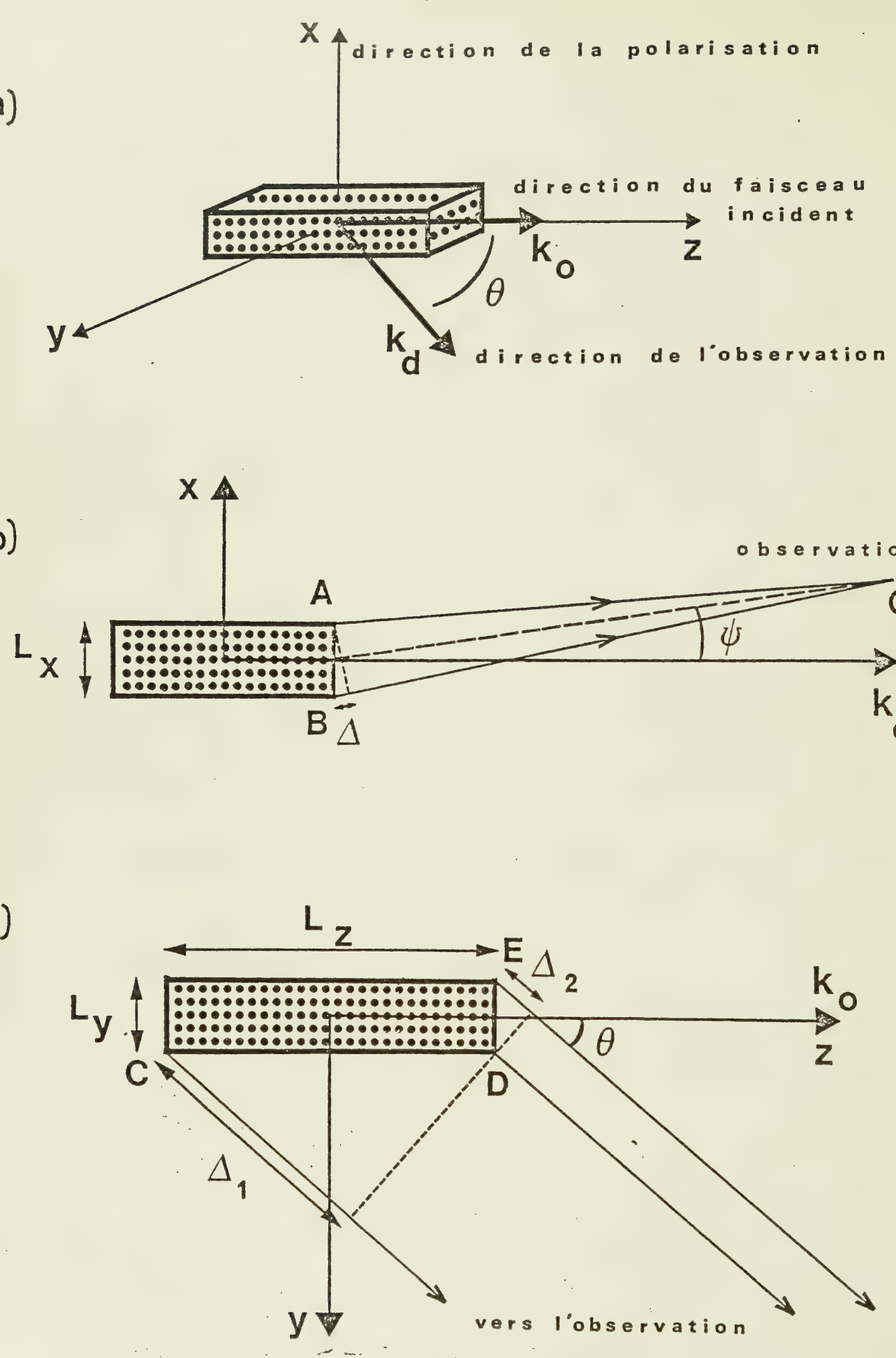
Nous avons utilisé un laser Spectra Physics de 15 mW (modèle 124). La longueur d'onde d'émission (λ_o = 6328 Å) présente l'avantage d'être en dehors du spectre d'absorption d'un grand nombre de protéines. Le mode T E M d'un tel laser signifie que l'onde lumineuse est une onde électromagnétique transverse. Les différents modes longitudinaux sont distants de 214 MHz, ce qui permet l'étude de spectres de largeurs allant jusqu'à 50 MHz (ou de temps de corrélation supérieurs à 10 nS) . La polarisation de l'onde est verticale.

2) Les dimensions du volume éclairé : problème de la cohérence spatiale.

Le champ diffusé par le volume de solution éclairé présente deux caractéristiques importantes :
- la forme géométrique des surfaces d'onde,
- le domaine de cohérence spatiale sur chacune de ces surfaces d'onde.

Le terme de cohérence spatiale signifie qu'il y a relation de phase ou corrélation entre les amplitudes instantanées du champ électrique en deux points distincts.

L'étude de la cohérence spatiale résulte du fait que les performances d'un spectromètre à battements de photons sont liées à la *puissance diffusée par angle solide de cohérence* et non à la puissance totale diffusée. Les dimensions de cet angle solide de cohérence dépendent de deux facteurs :
- la forme du volume diffusant V,
- les angles de diffusion θ et Φ (Φ est l'angle entre le vecteur polarisation de l'onde incidente et le vecteur d'onde $\vec{k_d}$ de l'onde diffusée ; θ est l'angle entre le vecteur d'onde de l'onde incidente $\vec{k_o}$ et le vecteur d'onde de l'onde diffusée $\vec{k_d}$).



Chapitre II - Figure 2 -

a) géométrie du volume diffusant V

b) projection dans le plan (x, k_d)

c) projection dans le plan (y, z)

Le calcul des fonctions de corrélation spatiale montre qu'il y a une analogie entre les propriétés de cohérence spatiale et la théorie de la diffraction à l'infini ; à la surface d'une sphère centrée sur le volume diffusant V et de rayon très grand devant les dimensions de V, le champ diffusé résultant peut être considéré comme correspondant à la somme des figures de diffraction de la "source" V et le comportement de la fonction de corrélation spatiale est complètement déterminé par la figure de diffraction du volume diffusant.

Pour calculer l'angle solide de cohérence, nous utiliserons donc une approche basée sur la théorie de la diffraction.

Soit un système d'axes x y z tels que l'axe des z soit orienté parallèlement à $\overrightarrow{k_o}$ et l'axe des x parallèlement au vecteur polarisation de l'onde incidente. Nous considèrerons le cas où $\Phi = 90°$, c'est-à-dire $\overrightarrow{k_d}$ dans le plan (y, z), correspondant à nos conditions expérimentales. Dans le cas d'un volume diffusant ayant la forme d'un parallélépipède rectangle (figure 2 (a)) de dimensions L_x, L_y, L_z, l'angle solide de cohérence Ω_{coh} peut être exprimé simplement en fonction de la direction d'observation et des dimensions du volume diffusant.

Dans le plan (x, k_d) le volume éclairé se réduit à un rectangle dont l'un des côtés est L_x (figure 2 (b)) ; si on s'écarte d'un angle ψ de la direction d'observation $\overrightarrow{k_d}$, au point d'observation O ainsi défini, la différence de phase $\Delta\phi$ entre les ondes provenant des 2 points extrêmes A et B varie avec l'angle ψ à la vitesse :

$$\frac{d(\Delta\phi)}{d\psi} = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{d\Delta}{d\psi} = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{d(L_x \sin\psi)}{d\psi}$$

De part et d'autre du point correspondant à $\psi = 0$, la cohérence disparait quand la différence de phase devient égale à π, soit :

$$\Delta\psi = \frac{\lambda}{2 L_x}$$

Dans le plan (y, z) le volume éclairé se réduit à un rectangle de dimensions L_y et L_z (figure 2 (c)). La différence de marche pour deux rayons issus des points C et D est :

$$\Delta_1 = L_z |\cos\theta| .$$

La différence de marche pour deux rayons issus des points E et D est :

$$\Delta_2 = L_y \sin\theta.$$

Toutes les deux sont fonctions de θ. Pour une observation dans la direction θ, la différence de phase $\Delta\phi'$ des ondes issues des points extrêmes C et E varie avec l'angle d'observation θ avec la vitesse :

$$\frac{d(\Delta\phi')}{d\theta} = \frac{2\pi}{\lambda}\frac{d(\Delta_2 - \Delta_1)}{d\theta} = \frac{2\pi}{\lambda}(L_y\,|\cos\theta| + L_z \sin\theta)$$

Cette différence de phase varie de π pour :

$$\Delta\theta = \frac{\lambda}{2(L_y\,|\cos\theta| + L_z \sin\theta)}$$

Finalement ,

$$\Omega_{coh}\,(\theta,\ \phi = 90°) = 4\,\Delta\theta.\,\Delta\psi = \frac{\lambda^2}{L_x(L_z \sin\theta + L_y\,|\cos\theta|)}$$

L'angle solide de cohérence dans la direction θ est donc inversement proportionnel aux dimensions du volume éclairé projetées dans un plan perpendiculaire à la direction d'observation. Mais, comme il a été dit précédemment, la grandeur intéressante est la puissance diffusée par angle solide de cohérence, soit :

$$P_{coh} = 2\,P_o\,R\,L_z\,\frac{\lambda^2}{L_x(L_z \sin\theta_1\ L_y\,|\cos\theta|\ )}\ ,\ \text{pour}\ \phi = 90°,$$

où P_o = puissance incidente

R = coefficient de Rayleigh

λ = longueur d'onde dans le milieu diffusant

P_{coh} dépend donc des dimensions géométriques du milieu diffusant d'après la relation :

$$P_{coh} \propto \frac{1}{L_x(\sin\theta + \frac{L_y}{L_z}\,|\cos\theta|)}$$

Remarquons, tout d'abord, que, pour optimiser P_{coh}, il faut rendre la dimension du volume diffusant dans une direction normale au plan de diffusion, L_x, aussi petite que possible . Ceci est réalisé en focalisant le faisceau laser sur l'échantillon ; le volume éclairé, ainsi obtenu, a grossièrement la forme d'un cylindre si la lentille utilisée n'est pas trop convergente. Pour un faisceau incident de diamètre d = 1,5 mm focalisé avec une lentille d'assez faible distance focale (f = 13,3 cm),

$$L_x = L_y = \frac{4}{\pi}\frac{\lambda f}{d} \simeq 70\ \mu$$

D'autre part, seul le rapport L_y/L_z intervient, L_z étant la longueur de V dans la direction du faisceau incident et L_y sa largeur dans le plan de diffusion ; P_{coh} est d'autant plus grand que le rapport L_y/L_z est petit. Suivant le type d'expérience, la solution est contenue dans deux sortes de cuves, soit dans une cuve carréeHellma pour les observations à 90°, soit dans une cuve cylindrique en pyrex, mais dans les deux cas le trajet optique

est de 10 mm et les faisceaux lumineux sont normaux à la surface de verre, ne subissant donc pas de réfraction. Le faisceau diffusé est focalisé, par l'intermédiaire d'une lentille (f = 5 cm) située à 90 cm de la solution, sur un petit diaphragme (diamètre = 0,3 mm) placé devant la photocathode du photomultiplicateur ; dans ces conditions, le photomultiplicateur ne voit qu'une portion de la longueur du volume éclairé, soit :

$$L_z \simeq 5 \text{ mm}$$

Pour les valeurs de L_x, L_y et L_z que nous venons de citer, P_{coh} peut présenter deux types de variation suivant que θ sera supérieur ou inférieur à une certaine valeur θ_c, telle que :

$$\theta_c = \text{Arctg} \frac{L_y}{L_z} \lesssim 1°$$

Tous les angles de diffusion utilisés lors des expériences se situent dans le domaine $[30° < \theta < 90°]$, soit $\text{tg}\,\theta >> \frac{L_y}{L_z}$, on a alors :

$$\Delta\theta \simeq \frac{\lambda}{2\, L_z \sin\theta}$$

et $P_{coh} \simeq 2\, P_o\, R\, \frac{\lambda^2}{L_x \sin\theta}$

Les conditions pour que P_{coh} soit maximum sont réalisées.

3) La détection : photomultiplicateur

Le fait physique dont on veut prendre connaissance est une émission d'énergie sous forme lumineuse qui évolue selon une certaine fonction du temps. Les détecteurs photosensibles habituels ne permettent pas de suivre les phénomènes à variation rapide ; par contre, la conversion par photoémission d'un flux de photons en un flux d'électrons émis dans le vide présente plusieurs avantages :

- elle est instantanée,
- elle est linéaire,
- une information, mise sous forme électrique, est plus facilement utilisable.

Pour les instruments d'exploitation il faut une intensité de quelques ampères. L'efficacité médiocre avec laquelle les meilleures couches photoélectriques transforment les photons en électrons, ainsi que le niveau toujours faible du flux lumineux dont on dispose, s'opposent à ce que des intensités de cet ordre puissent être attendues à la sortie de la photocathode ; il faut que le récepteur photoélectrique comporte un amplificateur incorporé. C'est le cas du photomultiplicateur . Il associe, à une cathode photoémissive, un organe dont la fonction est de multiplier le flux électronique émis par

cette dernière ; son fonctionnement est basé sur l'émission secondaire d'électrons par les solides sous l'effet d'un bombardement électronique primaire.

Le photomultiplicateur que nous avons utilisé est un tube 56 T V P (Radiotechnique). La photocathode a un diamètre de 4 2 mm ; on exige de la cathode un rendement de conversion aussi élevé que possible : les cathodes de type S_{-20} (couche en Sb-Na-K-Cs) sont celles qui ont le meilleur rendement pour $\lambda = 6328$ Å. Viennent ensuite l'électrode de focalisation et l'accélératrice réunie intérieurement à la première dynode. Le système de multiplication comprend 14 étages en tout. A son autre extrémité, le multiplicateur s'achève sur une électrode collectrice ou anode, qui est destinée à recueillir le flux d'électrons issus du dernier étage de multiplication. L'ensemble est enfermé dans une enveloppe étanche, à l'intérieur de laquelle règne un vide aussi poussé que possible.

Le photomultiplicateur délivre des impulsions de largeur de l'ordre de 5 ns ; il est suivi d'une électronique rapide qui effectue une détection digitale : pour l'évaluation de l'intensité comme pour l'analyse des spectres, l'information sera obtenue à partir des impulsions recueillies à la sortie de ce détecteur. Ces impulsions sont d'abord mises en forme dans un préamplificateur A.T.N.E. (Applications des Techniques Nouvelles en Electronique); leur hauteur doit dépasser un certain seuil (réglable) pour donner une impulsion standardisée ; on évite ainsi de compter les rebonds et signaux parasites. Elles sont ensuite envoyées en parallèle sur un compteur (Hewlett Packard) et sur le corrélateur (A.T.N.E.).

4) Le corrélateur

Alors qu'avec un analyseur d'onde on peut mesurer la densité spectrale des fluctuations du photocourant, transformée de Fourier de la fonction de corrélation $< i(t)\ i(t + \tau) >$, un corrélateur permet d'obtenir en temps réel les fonctions d'autocorrélation. Le principe de cet appareil est le suivant : il mesure $i(t)$, $i(t + \Delta t)$, ... $i(t + \ell\ \Delta t)$ ..., et accumule les résultats dans ses mémoires. Il recommence N fois cette opération et fait les moyennes des produits $i(t) \times i(t + \ell\ \Delta t)$ sur ces N mesures.

Le corrélateur que nous avons utilisé est un corrélateur A.T.N.E. à 24 canaux ($1 \leqslant \ell \leqslant 24$) ; il procède à une analyse digitale directe du signal impulsionnel et peut traiter des fréquences allant de 0 à 100 MHz ; le retard incrémental Δt est réglable de 10 ns à 1 ns. Le signal échantillonné est dirigé sur deux voies A et B ; sur la voie B le signal passe dans un registre à décalages. Le nombre de pas de ce registre indique le nombre de canaux (ou

nombre de multiplications effectuées). L'ensemble est synchronisé par une horloge interne à quartz. A chaque pas, le contenu de chaque canal est multiplié par le signal arrivant sur la voie A et accumulé dans une mémoire correspondante (figure 3). Puis, le signal de chaque registre est décalé d'un pas et le traitement est recommencé ; on construit ainsi la fonction d'autocorrélation - on dit que le traitement est fait en temps réel parce qu'il est effectué simultanément sur tous les canaux -.

Ce type de calcul digital est lent ; il devient plus rapide si, au lieu d'effectuer à chaque pas des multiplications à plusieurs digits, on n'effectue que des opérations à un digit (au moins sur l'une des voies). Ceci est réalisé dans le corrélateur digital à simple seuil ; l'une des entrées (voie B) est quantifiée en deux niveaux 0 et 1 suivant que le nombre d'impulsions reçues sur cette entrée, pendant le retard incrémental Δt choisi, a ou n'a pas dépassé un nombre k préaffiché (seuil) compris entre 0 et 15, bornes comprises (figure 4). Sur l'autre entrée, le nombre de niveaux de quantification ne dépend que du nombre maximal d'impulsions admissibles dans le temps Δt choisi.

On voit que la multiplication est plus simple, le signal ne pouvant prendre sur la voie B que la valeur 0 ou 1.

Dans le cas d'un signal gaussien, la fonction d'autocorrélation d'un signal écrêté s'exprime directement en fonction de la fonction d'autocorrélation du signal non écrêté :

$$g_k^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1 + k}{1 + \bar{n}} \left| g^{(1)}(\tau) \right|^2$$

La comparaison entre cette équation et la relation de Siegert (Chap.I, p. 12) montre que l'écrêtage n'a pas altéré la dépendance temporelle de la fonction d'autocorrélation ; en fait, pour $k \simeq \bar{n}$ les deux relations deviennent similaires. Le mode de fonctionnement en densité de probabilité des impulsions permet de connaitre le nombre moyen d'impulsions $\bar{n}$ reçu pendant l'intervale de temps Δt choisi et, par conséquent, de choisir $k \simeq \bar{n}$.

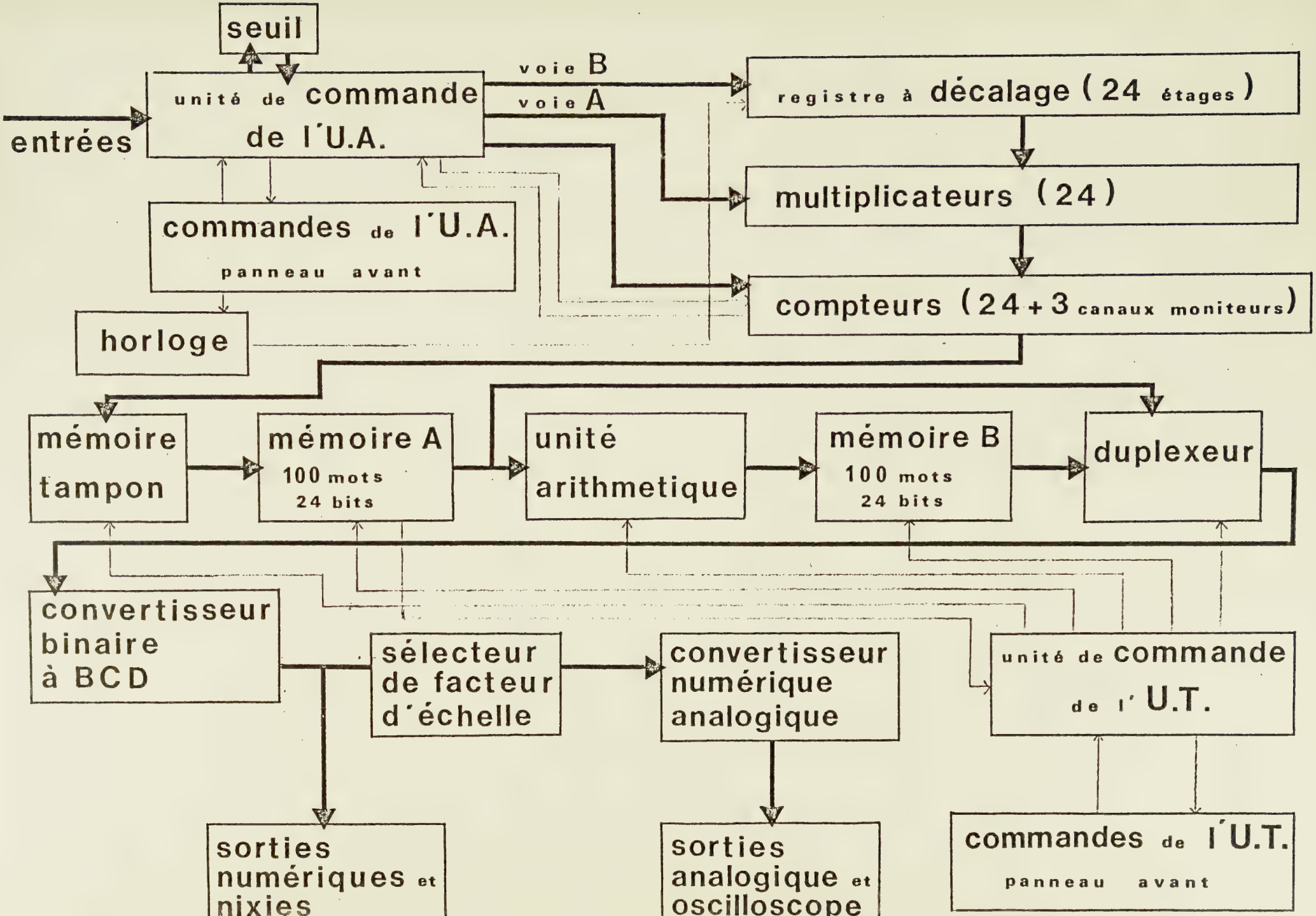
Chapitre II - Figure 3 : Bloc diagramme simplifié du corrélateur digital.

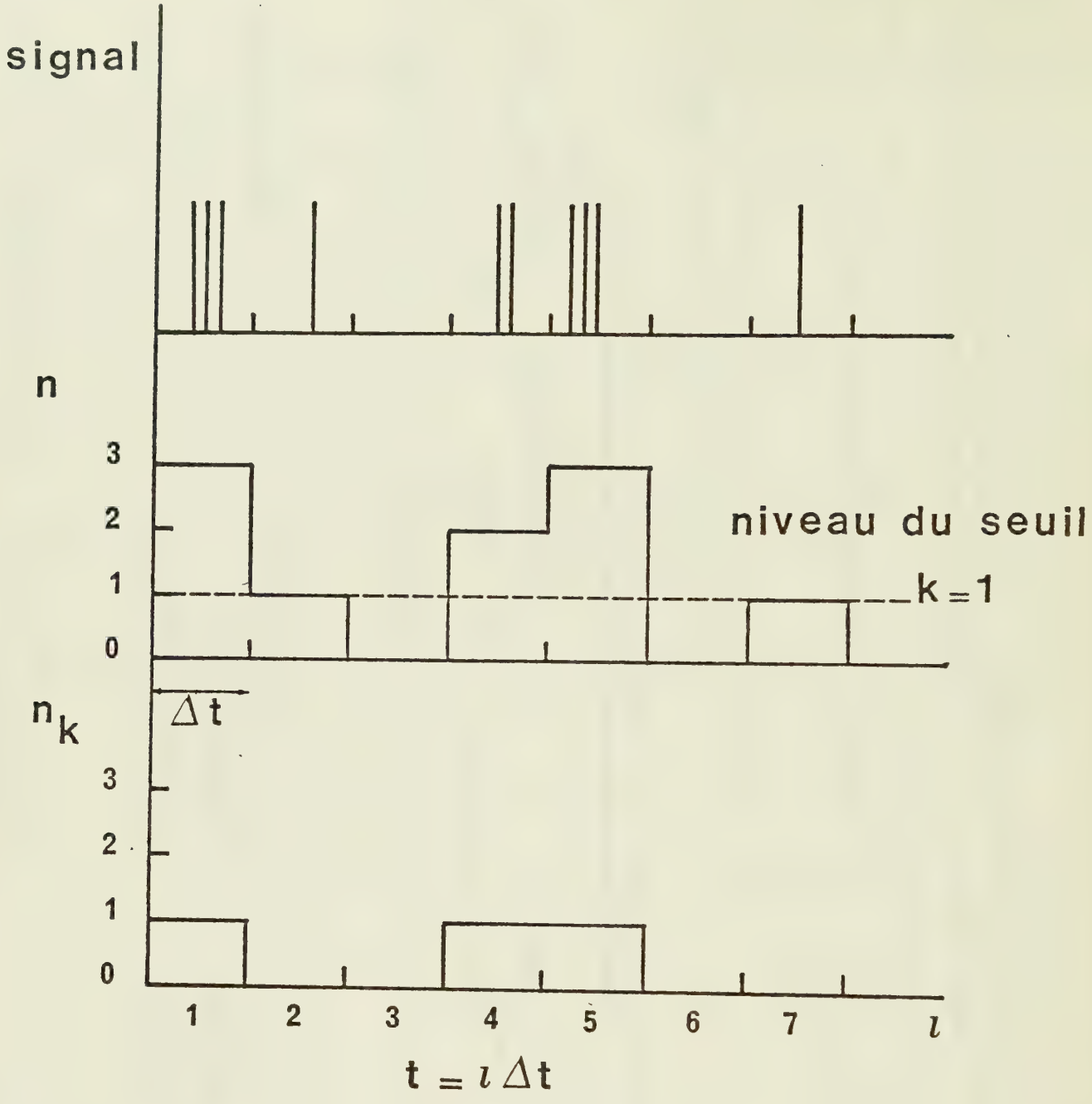
U.A. : unité d'acquisition

U.T. : unité de traitement

⟹ : connexions véhiculant l'information

⟶ : connexions de commande et de contrôle


seuil
unité de commande de l'U.A.
entrées
voie B
voie A
registre à décalage (24 étages)
multiplicateurs (24)
commandes de l'U.A.
panneau avant
compteurs (24+3 canaux moniteurs)
horloge
mémoire tampon
mémoire A
100 mots
24 bits
unité arithmetique
mémoire B
100 mots
24 bits
duplexeur
convertisseur binaire à BCD
sélecteur de facteur d'échelle
convertisseur numérique analogique
unité de commande de l'U.T.
sorties numériques et nixies
sorties analogique et oscilloscope
commandes de l'U.T.
panneau avant


signal
n
3
2
1
0
niveau du seuil
k = 1
Δ t
n_k
3
2
1
0
1
2
3
4
5
6
7
ι
t = ι Δ t

Chapitre II - Figure 4 : Représentation schématique du système de seuil.

$$\begin{cases} n_k(t) = 0 \quad \text{si } n(t) \leqslant k, \\ n_k(t) = 1 \quad \text{si } n(t) > k. \end{cases}$$

Δt est le temps d'échantillonnage.

III - Méthodes d'analyse des résultats expérimentaux

Le problème de la monodispersité d'une solution est l'un des problèmes les plus importants - si ce n'est le plus important - en diffusion de la lumière. Mais on dispose en biologie d'un certain nombre de techniques (ultracentrifugation, électrophorèse, chromatographie etc...) et de méthodes chimiques qui permettent de contrôler la pureté d'une préparation biologique.

Dans le cas d'une préparation protéique, même après purification, la présence dans la solution de diverses espèces moléculaires n'est pas exclue comme nous le verrons aux chapitres III et IV ; mais cette polydispersité correspond toujours à une distribution discrète, chaque espèce (polymère) étant un multiple entier d'une unité monomérique.

Par contre, dans le cas d'une préparation de vésicules membranaires, les clichés de microscopie électronique (cf. chapitre V) montrent toute une distribution continue de diamètres autour d'une valeur moyenne.

Dans la plupart des cas, une méthode itérative a été utilisée pour l'analyse des résultats expérimentaux ; cette méthode, très utile dans le cas de solutions monodisperses, s'est révélée insuffisante dans le cas de solutions polydisperses. Une nouvelle méthode d'analyse, appelée méthode des cumulants, a alors été mise au point, elle a été appliquée à l'étude de l'hétérogénéité d'une préparation membranaire (Chapitre V, paragraphe III).

1) Cas d'une solution monodisperse : méthode itérative.

Dans le cas d'une solution contenant une seule espèce, de coefficient de diffusion de translation unique D_T, la fonction d'autocorrélation du photocourant peut s'écrire sous la forme :

$$C(\tau) = A + B\, e^{-\tau/\tau^*},$$

où A et B sont des constantes qui dépendent des conditions expérimentales ; la constante de temps de l'exponentielle τ^* est liée au coefficient de diffusion de translation D_T par la relation :

$$\tau^* = \frac{\tau_R}{2} = \frac{1}{2\,K^2 D_T} \qquad \text{(cf. chapitre I).}$$

La fonction $C(\tau)$ comporte trois inconnues A, B et τ^* qu'il faut déterminer. Pour faire ce calcul, le processus suivant a été adopté.

Dans le cas du corrélateur à 24 canaux, au contenu X_ℓ de chaque canal ($1 \leqslant \ell \leqslant 24$) correspond une valeur théorique $A + B\,\alpha^\ell$, si l'on pose $\alpha = e^{-\Delta t/\tau^*}$, et il s'agit de déterminer les valeurs A, B et α rendant minimum la fonction :

$$f\ (A,\ B,\ \alpha)\ =\ \sum_{\ell=1}^{\ell=24}\ (A + B\ \alpha^{\ell} - X_{\ell})^2$$

CCette fonction n'étant pas linéaire par rapport à la variable α, une méthode de régression linéaire n'est pas applicable; par contre, il est possible d'appliquer une méthode itérative (Williams, 1959) basée sur le principe suivant :

On donne une valeur provisoire α_o à l'inconnue α ; si α est voisine de α_o, on peut écrire le développement :

$$\alpha^{\ell}\ \simeq\ \alpha_o^{\ell}\ +\ \ell.\alpha_o^{(\ell-1)}\ (\alpha - \alpha_o)$$

Il s'agit alors de rechercher les valeurs de α, A, B rendant minimum :

$$f\ (A,\ B,\ \alpha)\ =\ \sum_{\ell=1}^{\ell=24}\ \left|A + B\ \alpha_o^{\ell} + \ell\ (\alpha - \alpha_o)\ B\ \alpha_o^{\ell-1} - X_{\ell}\right|^2$$

et si l'on pose $(\alpha - \alpha_o)\ B = C$,

$$f\ (A,B,C)\ =\ \sum_{\ell=1}^{\ell=24}\ \left|\ A + B\ \alpha_o^{\ell} + \ell\ C\ \alpha_o^{\ell-1} - X_{\ell}\right|^2$$

Cette expression est maintenant linéaire par rapport aux trois variables A, B, C ; il suffit alors d'annuler les dérivées $\frac{\partial f}{\partial A}$, $\frac{\partial f}{\partial B}$, $\frac{\partial f}{\partial C}$ pour la rendre minimale.

On aboutit ainsi à un système du type :

$$\begin{pmatrix} A \\ B \\ C \end{pmatrix}\ =\ M^{-1} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{pmatrix}$$

où M est une matrice 3 × 3, d'élément : $\delta_{m,n} = \sum_{\ell=1}^{\ell=24}\ \beta_m(\ell)\ \beta_n(\ell)$

et $x_m = \sum_{\ell=1}^{\ell=24} \beta_m(\ell)\ X_{\ell}$, avec $\beta_1 = 1$, $\beta_2 = \alpha_o^{\ell}$, $\beta_3 = \ell\alpha_o^{\ell-1}$

A partir de la valeur provisoire α_o, il est alors possible de calculer les valeurs correspondantes de A, B et C ; on en déduit une nouvelle valeur pour α :

$$\alpha_1 = \alpha_o + \frac{C_o}{B_o}$$

Le cycle est recommencé et ainsi de suite jusqu'à l'ordre n pour lequel $\left|\frac{C_n}{B_n}\right| < \varepsilon$, valeur très petite que l'on fixe. La valeur de α_{n+1} ainsi trouvée permet de déterminer le coefficient de diffusion de translation de l'espèce en solution.

2) Cas d'une solution polydisperse : méthode des cumulants

Dans le cas d'une solution contenant plusieurs espèces, la fonction d'autocorrélation du champ diffusé est la superposition de plusieurs exponentielles et s'écrit :

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma)\, e^{-\Gamma\tau} d\Gamma ,$$

où $G(\Gamma)$ est la distribution des constantes de vitesse normalisée définie de la façon suivante :

- $G(\Gamma)\, d\Gamma$ = fraction de l'intensité totale diffusée due aux molécules dont la valeur $K^2 D_T$ se trouve dans l'intervalle $[\Gamma, \Gamma + d\Gamma]$
- $\int_0^\infty G(\Gamma)\, d\Gamma = 1.$

Le but de l'analyse est de déterminer la distribution $G(\Gamma)$. La difficulté provient du fait que l'obtention de cette distribution par inversion de la transformée de Laplace nécessite une précision sur les points expérimentaux qui n'est jamais atteinte dans la majorité des cas. Il faut donc adopter une autre méthode pour obtenir des informations sur cette distribution ; deux approches très voisines ont été proposées, l'une par Koppel (1972) l'autre par Pusey et al. (1973). Dans les deux cas, la distribution $G(\Gamma)$ est caractérisée par ses cumulants - ou ses moments -.

L'approche proposée par Pusey est assez simple et basée sur le développement en série de la fonction $e^{-\Gamma\tau}$ autour de $e^{-\bar{\Gamma}\tau}$ où :

$$\bar{\Gamma} = \langle \Gamma \rangle = \int_0^\infty \Gamma\, G(\Gamma)\, d\Gamma.$$

La méthode proposée par Koppel, que nous allons exposer brièvement, est plus générale et basée sur le formalisme de la fonction génératrice de cumulants. *Cette méthode d'analyse peut être appliquée à toute expérience aboutissant à une somme ou distribution d'exponentielles.*

Enonçons, tout d'abord, quelques définitions. Il y a analogie formelle entre la fonction de corrélation et la fonction génératrice de moments pour la variable aléatoire Γ :

$$g^{(1)}(\tau) = M_\Gamma(-\tau),$$

et le développement en série de Mac-Laurin de la fonction génératrice donne une relation entre les moments de la distribution,

$$\mu_m = \int_0^\infty \Gamma^m\, G(\Gamma)\, d\Gamma ,$$

et les dérivés de $M_\Gamma(-\tau)$ par rapport à $(-\tau)$:

$$\mu_m = \left[\frac{d^m M_\Gamma(-\tau)}{d(-\tau)^m}\right]_{(-\tau)=0}$$

De même, on définit une fonction génératrice de cumulants, qui est le logarithme de la fonction génératrice de moments :

$$\mathcal{C}_\Gamma(-\tau) = \text{Log}\left[M_\Gamma(-\tau)\right] ,$$

et le cumulant d'ordre m pour la variable Γ, Km, est le coefficient de $\frac{(-\tau)^m}{m}$ dans le développement en série de Mac-Laurin de $\mathcal{C}_\Gamma(-\tau)$, soit :

$$\mathcal{C}_\Gamma(-\tau) = \sum_{m=1}^{\infty} K_m \frac{(-\tau)^m}{m!} \quad \text{avec}$$

$$K_m = \left[\frac{d^m\left[\mathcal{C}_\Gamma(-\tau)\right]}{d(-\tau)^m}\right]_{(-\tau)=0}$$

Il existe des relations mathématiques entre cumulants et moments pour une distribution donnée de la variable aléatoire Γ (Bennet et Franklin).

Considérons maintenant l'application de la méthode des cumulants à l'analyse des résultats expérimentaux en D.Q.E.L. Le principe consiste à ajuster un polynome sur la fonction $\text{Log}\,|g^{(1)}(\tau)|$ obtenue, soit :

$$\text{Log}\,|g^{(1)}(\tau)| = -K_1\tau + K_2\frac{\tau^2}{2!} + \ldots + K_m\frac{(-\tau)^m}{m!} + \ldots ,$$

et les valeurs des coefficients K_1, K_2 ... K_m déterminées ainsi correspondent aux cumulants d'ordre 1, 2 ... m de la distribution G(Γ).

Si la solution est monodisperse, la fonction de corrélation est une simple exponentielle :

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-\Gamma_1\tau} ;$$

la fonction génératrice de cumulants,

$$\mathcal{C}_\Gamma(-\tau) = \text{Log}\,|g^{(1)}(\tau)| = -\Gamma_1\tau ,$$

est alors une fonction linéaire de τ, et seul le cumulant d'ordre 1 est différent de zéro :

$$K_1 = \Gamma_1$$

Par contre, si la solution est polydisperse, il va apparaitre des termes d'ordre supérieur en τ dans le développement en série de :

$$\mathcal{C}_\Gamma(-\tau) = \text{Log}\,|g^{(1)}(\tau)| .$$

Dans le cas d'un nombre N d'espèces i, de masse moléculaire M_i, à la concentration C_i :

$$G(\Gamma) = \frac{\sum_{i=1}^{i=N} C_i M_i \delta(\Gamma - \Gamma_i)}{\sum_{i=1}^{i=N} C_i M_i} ,$$

et le cumulant d'ordre 1,

$$K_1 = \bar{\Gamma} = \int_0^\infty \Gamma G(\Gamma) d\Gamma ,$$

est proportionnel à un coefficient de diffusion moyen :

$$\bar{D}_z = \frac{\bar{\Gamma}}{K^2} = \frac{\Sigma C_i M_i D_i}{\Sigma C_i M_i} ;$$

c'est cette "moyenne z" des coefficients de diffusion de translation qui, combinée au coefficient de sédimentation moyen S_W, permet de calculer la masse moléculaire moyenne en poids M_W. Le cumulant d'ordre 2, K_2, normalisé par rapport à K_1^2, donne une bonne évaluation de la largeur de la distribution $G(\Gamma)$, le cumulant d'ordre 3, K_3, une idée de la disymétrie. Pour une distribution gaussienne centrée, par exemple, les cumulants d'ordre supérieur à 2 sont nuls.

Ce type d'analyse nécessite une évaluation aussi exacte et précise que possible de l'asymptote de la courbe expérimentale ; dans ce but, un retard supplémentaire de 80 Δt a été intercalé avant les quatre derniers canaux du corrélateur. Cette modification du corrélateur n'ayant été réalisée que très récemment, la méthode des cumulants n'a pu être appliquée qu'à l'étude d'une préparation membranaire (chapitre V, paragraphe III).

Je tiens à remercier très sincèrement Rémi Jullien pour son aide efficace lors de la mise au point des programmes d'analyse.

IV - Références bibliographiques pour le chapitre II

BENNET, C.A. et FRANKLIN, N.L. - Statistical Analysis in Chemistry and the chemical industry, John Wiley ed., chapitre 4 : mathematical machinery.

KOPPEL, D.E. (1972) J. Chem. Phys. 57, 4814-4820.

PUSEY, P.N., KOPPEL, D.E., SCHAEFER, D.W., CAMERINI-OTERO, R.D., KOENIG, S.H. (1974) - Biochemistry, 13, 952-959.

WILLIAMS, E.J. (1959) Regression analysis, John Wiley and Sons ed.

CHAPITRE III

APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE DE LA CONFORMATION D'UN ENZYME OLIGOMERIQUE : LA β-GALACTOSIDASE D'E. COLI

Abréviations utilisées dans ce chapitre

B.N.G. : 6-bromo-2-naphtyl-β-D-galactopyranoside.

D.E.A.E. : diéthyl amino éthane.

D.T.T. : dithiothreitol.

E.D.T.A. : acide éthylène diamine tétraacétique.

O.N.P.G. : O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside.

T.E.S. : acide N-tris(hydroxyméthyl)méthyl-2-aminoéthane sulfonique.

T.R.I.S. : tris hydroxyméthyl aminométhane.

T.V.N.S. : solution tampon contenant :

T.R.I.S.	20 mM
E.D.T.A.	10 mM
NaCl	10 mM
pH	7,2

I - Introduction

La β-galactosidase est un enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse de certains sucres, des osides, plus spécifiquement les β-D-galactosides.

Une revue, parue il y a quelques années, sur l'ensemble des recherches effectuées sur la β-galactosidase (Wallenfels, Weil, 1971) montre que la connaissance de cet enzyme sur le plan structural est encore très limitée. La β-galactosidase purifiée est un enzyme oligomérique de poids moléculaire élevé (M ≃ 540 000), ce qui rend difficile toute étude de structure. Cet enzyme est constitué de 4 sous-unités identiques, chaque sous-unité comportant 1170 acides aminés et seules les séquences terminales ont été déterminées (Langley etal., 1975). Le protomère serait formé de deux globules, au moins, consécutifs au repliement de la chaine autour de deux centres de nucléation indépendants (Goldberg, 1969). Il y a un site actif par protomère (Cohn, 1957) mais aucun phénomène de coopérativité (positive ou négative) n'a été mis en évidence, ce qui laisserait supposer qu'il n'y a pas d'interactions entre les sites actifs des différentes sous-unités.

Trois mutants de cet enzyme ont été isolés par Perrin (1965) ; il a constaté que le site d'activité enzymatique n'était pas le seul affecté et que l'effet de la mutation se répercutait sur la structure quaternaire, puisque l'un est un tétramère, le second un monomère, le troisième un dimère.

Conjointement aux études sur les propriétés fonctionnelles poursuivies au laboratoire par Odile Viratelle et Patrick Deschavanne, il était intéressant de voir si une technique telle que la D.Q.E.L. apporterait des informations supplémentaires sur la taille et la forme de cet enzyme. Le but de ce travail a donc été d'étudier la structure oligomérique de cet enzyme et d'essayer de déceler si tout changement d'activité pouvait être lié à un changement de conformation.

II - Matériel et méthodes

L'étude des propriétés structurales de la β-galactosidase a nécessité l'utilisation de quelques techniques, couramment employées en enzymologie, que nous allons exposer brièvement dans ce chapitre.

1) L'enzyme

a. Préparation

L'enzyme a été préparé suivant la technique auparavant utilisée au laboratoire, inspirée de celle de D. Perrin (1965). On peut résumer brièvement les principales étapes de la purification comme suit :

- broyage des bactéries aux ultra-sons,
- précipitation des acides nucléiques au sulfate de streptomycine,
- précipitation de l'enzyme par le sulfate d'ammonium 35%,
- chromatographie sur une colonne de D.E.A.E. Séphadex avec élution par un gradient de force ionique.

Le facteur de purification est de l'ordre de 40.

b. Caractéristiques cinétiques

Les études cinétiques à l'état stationnaire (Viratelle, Yon, 1972) montrent qu'un schéma à deux intermédiaires, du type :

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} ES' \xrightarrow{k_3} E + P,$$

rend bien compte des propriétés de cet enzyme.

Le test d'activité habituellement utilisé est l'hydrolyse du substrat synthétique l'O-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (O N P G). Le processus expérimental est le suivant : on observe spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 373 nm la vitesse d'apparition du produit, l'O-nitrophénol. Pour déterminer les paramètres cinétiques :

$$k_{cat} = \frac{k_2\, k_3'}{k_2 + k_3'} \quad \text{et} \quad K_M = K_S \frac{k_3'}{k_2 + k_3'} \ ,$$

la courbe expérimentale est analysée à la calculatrice avec l'équation de Michaelis intégrée :

$$\frac{P}{t} = -\frac{K_M}{t} \operatorname{Log} \frac{P_\infty}{P_\infty - P} + V_M$$

où K_M est la constante de Michaelis,

P est la concentration du produit à l'instant t,

P_∞ est la concentration du produit lorsque $t \to \infty$,

V_M est la vitesse maximum de la réaction et elle est égale au produit de

la constante catalytique k_{cat} par la concentration totale d'enzyme.

En tampon T E S 33 mM, NaCl 145 mM, $MgSO_4$ 1 mM, pH 7, les constantes catalytiques de l'enzyme natif sont :

$$k_{cat} = 800\ s^{-1}\ ,\quad K_M = 10^{-4}\ M \text{ à } 25°C.$$

2) Méthodes d'analyse

L'électrophorèse et l'ultracentrifugation ont été utilisées comme méthodes de séparation des constituants d'un mélange, dans un but analytique ; dans un cas, la migration électrophorétique résulte du mouvement des particules sous l'action d'un champ électrique, dans l'autre cas, la sédimentation résulte du mouvement des particules sous l'action d'un champ de gravitation. Dans les deux cas, existe une force de frottement liée au coefficient de diffusion de translation qui compense la force motrice une fois la vitesse limite atteinte.

Le point isoélectrique de la β-galactosidase, déterminé par focalisation isoélectrique est 4,6 (Arrio) et lors de l'électrophorèse, effectuée à pH basique, le déplacement des divers constituants du mélange dépendra de leur charge et de leur coefficient de diffusion, d'ailleurs modifiés par la nature du solvant (pH et force ionique). Dans le cas de l'ultracentrifugation, la vitesse de sédimentation des différents constituants dépendra de leur masse et de leur coefficient de diffusion.

a. Electrophorèses

La technique utilisée est inspirée de la méthode d'Ornstein. Les gels utilisés sont des gels de polyacrylamide à 7,5 % de 0,5 × 5 cm. Ils sont chargés avec 100 µl de la solution d'enzyme. L'électrophorèse a lieu en tampon T R I S glycocolle pH 8,1, avec passage d'un courant de 1 mA par gel pendant 6 h, à la chambre froide. Deux types de coloration ont été utilisés : coloration protéique avec l'Amido Schwarz ou coloration spécifique, par l'intermédiaire du B N G comme substrat, avec le diazoblue comme colorant.

b. Ultracentrifugations

Les ultracentrifugations analytiques se font à une vitesse de 59780 tours par minute, à la température de 20°C.

3) Méthodes de purification

a. Dénaturation suivie d'une renaturation

La solution d'enzyme est dialysée pendant 8 heures à la température ambiante contre une solution d'urée 8M en tampon T.V.N.S.(T.R.I.S.20 mM, E.D.T.A.10 mM, NaCl 10 mM), D.T.T.3 mM, pH 7,2. L'urée est éliminée par deux dialyses successives de 5 heures contre le tampon T.V.N.S, D.T.T.3 mM, à la chambre froide puis une dialyse d'une nuit contre le tampon T.V.N.S.seul.

b. Gradient de sucrose

Les gradients linéaires 10% - 30% (poids/volume) sont réalisés avec un appareil I.S.C.O.; le sucrose a été dissous dans le tampon T.V.N.S., D.T.T. 1 mM, pH 7 et les solutions ont été préalablement filtrées sur charbon actif et dégazées. Les gradients, de 5 ml chacun, sont chargés avec 300 µl d'une solution concentrée d'enzyme. Les tubes sont ensuite soumis à une centrifugation de 35.000 tours/minute pendant 18 heures dans un rotor à godets mobiles du type SW 39L. La récupération en fractions de 0,25 ml se fait par le haut avec un appareil I.S.C.O. également; à l'aide d'une aiguille perceuse, une solution très concentrée ($\geq$ 30%) de sucrose est injectée très lentement au fond du tube ; l'absorbance des fractions est simultanément enregistrée. Le sucrose est ensuite éliminé par trois dialyses successives.

III - Existence de plusieurs formes oligomériques

1) Données bibliographiques

Le premier problème auquel on se heurte lorsqu'on veut faire l'étude de la structure quaternaire de cet enzyme est la présence de formes polymériques.

Depuis longtemps, l'existence de divers polymères a été constatée (Appel et al. (1965) signalent l'existence de 7 formes actives de β-galactosidase dans des extraits bruts d'E. coli), mais on ne sait pas si cette polydispersité est réelle , si elle est le résultat du procédé utilisé lors de la purification (Cohn, 1957), ou si elle est favorisée par certaines conditions de pH ou de force ionique (Wallenfels et al., 1959). A partir d'expériences d'ultracentrifugation, Marchesi et al. (1969) ont identifié six sortes de polymères comme étant des agrégats de type 4 N, 6 N, 8 N, 10 N, 12 N et 16 N, N étant l'unité monomérique ; mais il est difficile d'expliquer la présence des formes 6 N et 10 N sans supposer l'existence de dimère.

D'autre part, l'activité spécifique de tous ces polymères est-elle la même et analogue à celle du tétramère ? Marchesi et al. (1969) le pensent alors que Sund et Weber (1963) constatent une légère baisse d'activité (12%) lorsque la proportion de polymère "23 s" passe de 3 à 20%.

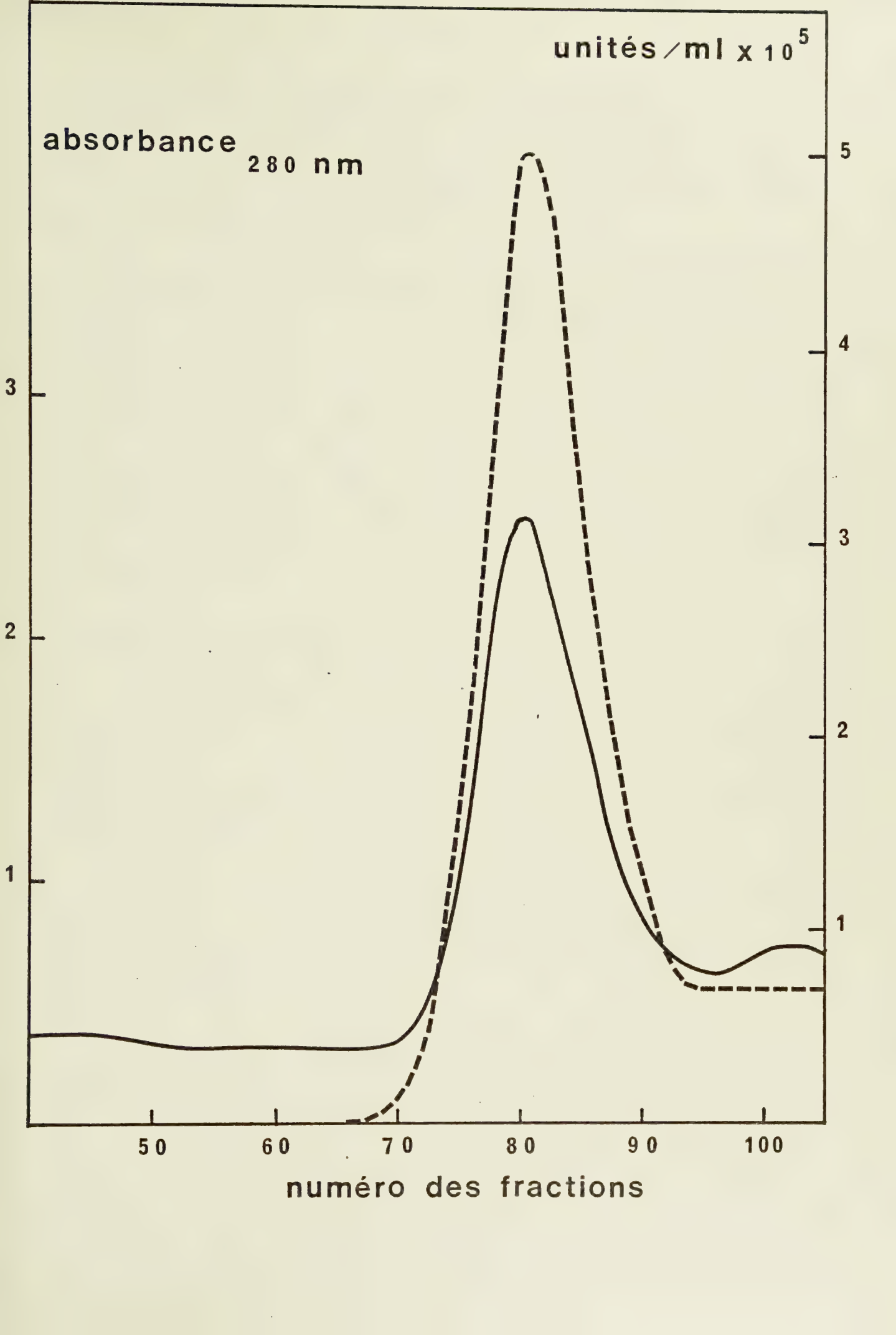
2) Préparation de l'enzyme.

C'est lors de la chromatographie, dernière étape de la préparation (cf. paragraphe II-1), qu'on peut espérer obtenir une bonne séparation entre les différentes formes de l'enzyme. Un profil d'élution type est représenté sur la figure 1. Des électrophorèses et des ultracentrifugations ont été réalisées sur des fractions situées de part et d'autre du maximum, dans les parties ascendante et descendante de la courbe d'élution. Sur les fractions qui précèdent le maximum apparait un composant plus léger que le tétramère, alors que sur les fractions qui le suivent on trouve au moins deux composants plus lourds, tous ces composants ayant une activité β-galactosidase.

3) Etude d'un mélange tétramère - polymère supérieur.

Une première préparation nous a permis d'obtenir un mélange constitué de tétramère et d'un polymère supérieur dans des proportions respectives de 90% et 10% d'après les clichés d'ultra centrifugation. Il nous a alors semblé intéressant de savoir si ce mélange correspondait à un équilibre entre plusieurs formes réelles de l'enzyme ou si les polymères supérieurs

Chapitre III - Figure I : Profil d'élution par un gradient de chlorure de sodium de la β-galactosidase adsorbée sur une colonne de D.E.A.E. Sephadex.
(Une unité correspond à la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 nmole d'O.N.P.G., par minute, à 25°C, dans un tampon phosphate monosidique-disodique 100 mM, pH 7, en présence de $MgSO_4$ 10^{-4}M, $MnSO_4$ 2.10^{-5}M, β-mercaptoéthanol 10^{-1}M).


unités / ml x 10^5
absorbance 280 nm
5
4
3
2
1
3
2
1
50
60
70
80
90
100
numéro des fractions

étaient des formes "transconformées" de l'enzyme, obtenues de façon irréversible. Or, l'ultracentrifugation analytique ne nous permettait pas d'étudier le comportement du mélange pour des concentrations inférieures à 2 mg/ml. La D.Q.E.L. semblait appropriée à une telle étude par l'intermédiaire des coefficients de diffusion de translation.

Nous avons donc commencé par étudier le coefficient de diffusion de translation apparent d'un tel mélange en fonction de la concentration, dans le domaine 0,2 - 2 mg/ml ; les résultats expérimentaux sont représentés sur la figure 2 ; dans le domaine considéré, ce coefficient apparent ne dépend pas de la concentration. D'autre part, des mesures d'intensité diffusée n'ont pas permis de déceler une modification de la masse moléculaire moyenne en poids. Il semble, par conséquent, qu'il n'y ait pas d'équilibre entre les différentes formes. A ce stade, la purification du tétramère pouvait être envisagée. Deux procédés ont été tentés : une dénaturation par l'urée 8 M suivie d'une renaturation par élimination de l'urée et une centrifugation en gradient de sucrose.

4) Purification du tétramère

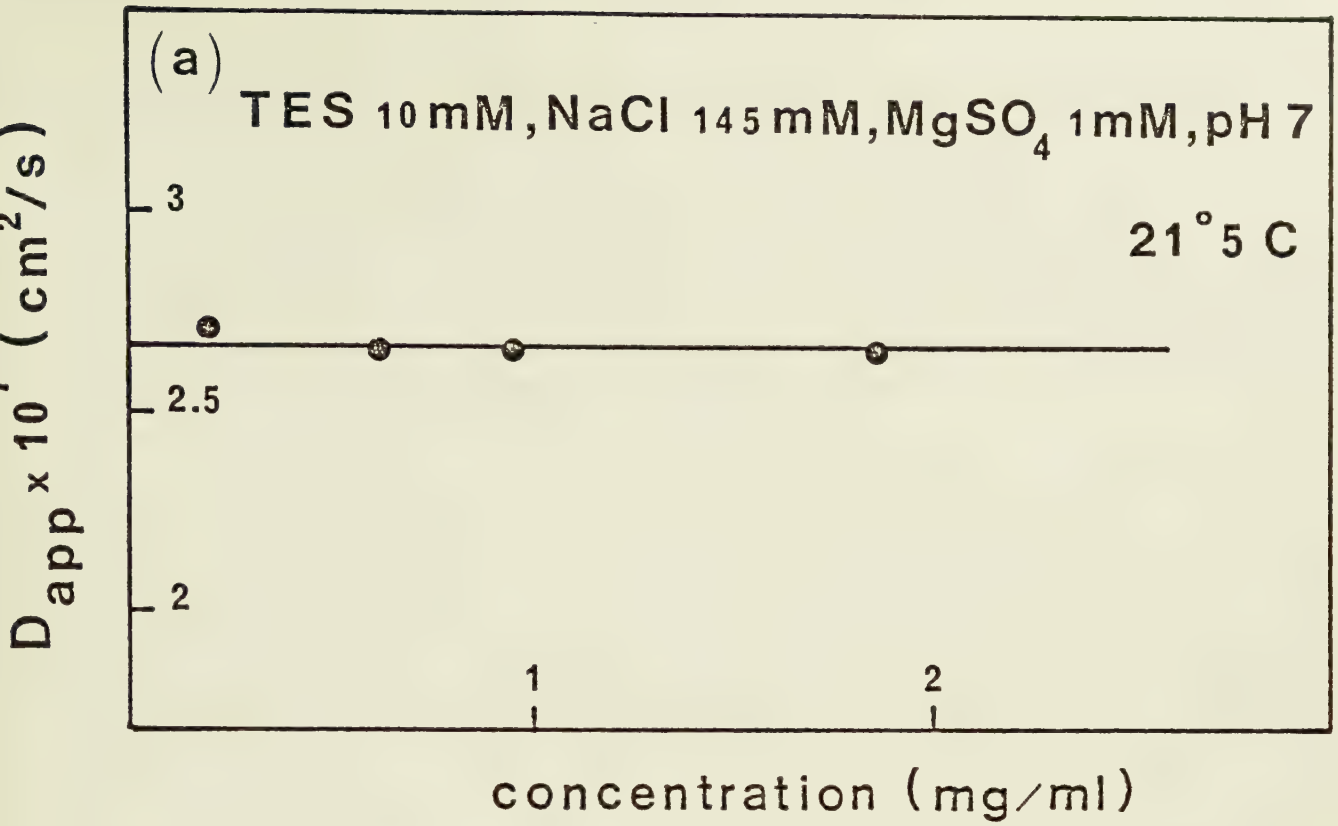
a. Dénaturation suivie d'une renaturation

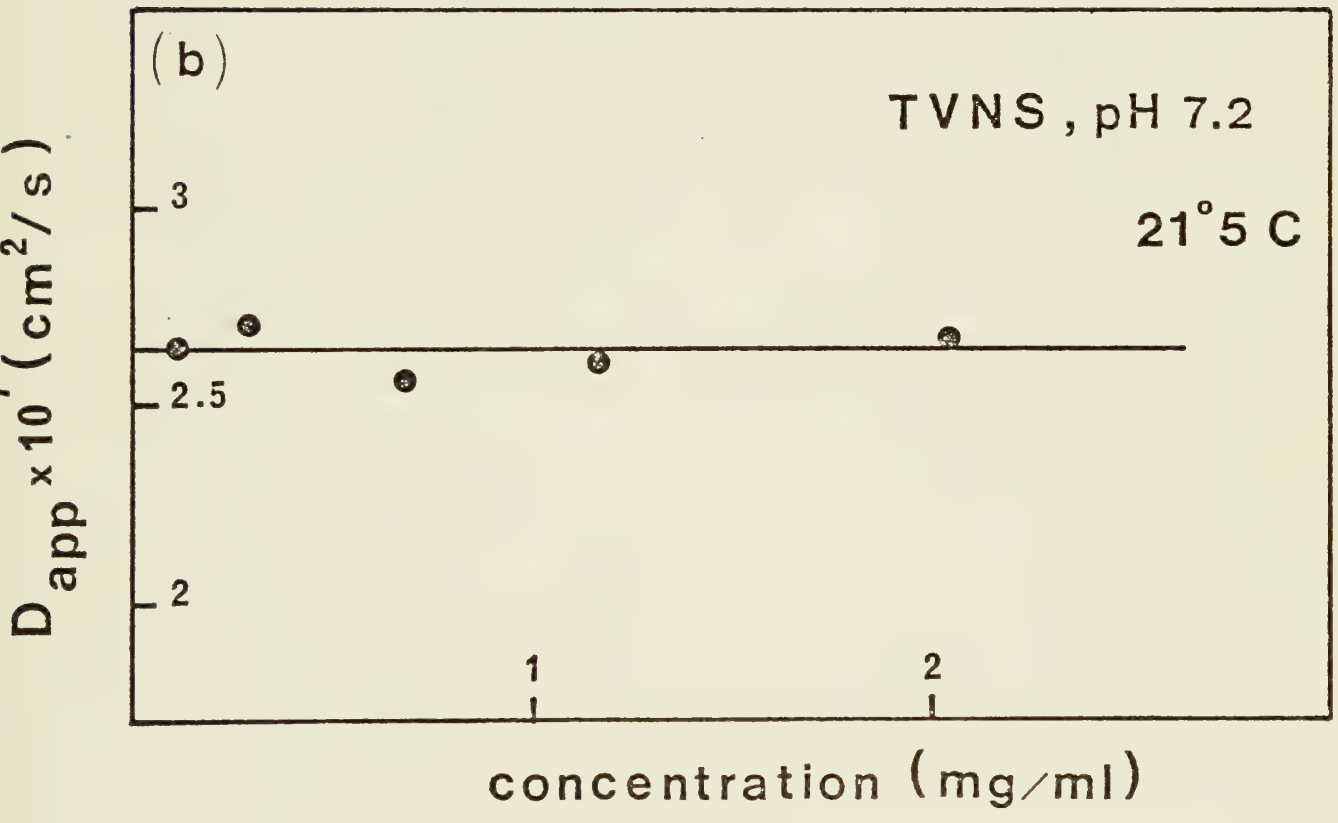
Zipser (1963), le premier, a constaté que la dénaturation par l'urée 8 M de cet enzyme était réversible ; il arrivait, par ce processus de dénaturation-renaturation à récupérer un certain pourcentage de l'activité initiale, ce pourcentage passant de 25% à 80% lorsque la concentration d'enzyme augmentait de 0,03 µg/ml à 30 µg/ml.

Cette étude fut reprise plus tard par Ullmann et Monod (1969) qui constatèrent que le traitement de la β-galactosidase sauvage par l'urée 8 M suivi d'une dialyse, permettait de retrouver une excellente activité, à condition d'éliminer complètement les cations divalents pendant le traitement et la dialyse.

Nous avons donc repris ces expériences en opérant dans des conditions expérimentales aussi proches que possible de celles proposées par ces derniers auteurs (voir paragraphe II-3). Nous avons fait subir simultanément ce traitement par l'urée à des solutions d'enzyme de concentrations différentes. Après renaturation, il a été procédé à des tests d'activité, des expériences de D.Q.E.L. et des électrophorèses. Nous avons constaté que le pourcentage d'activité retrouvé n'atteint jamais 100% et que ce pourcentage a tendance à diminuer quand la concentration d'enzyme augmente. Cette diminution correspond à une diminution du coefficient de diffusion de trans-

Chapitre III - Figure 2 : Coefficient de diffusion de translation apparent pour un mélange de tétramère (90%) et de polymère (10%) en présence et en l'absence d'ions Mg^{2+}.


(a)
TES 10 mM, NaCl 145 mM, MgSO4 1 mM, pH 7
21°5 C
3
2.5
2
1
2
D app x 10^7 (cm^2/s)
concentration (mg/ml)


(b)
TVNS, pH 7.2
21°5 C
3
2.5
2
1
2
D app x 10^7 (cm^2/s)
concentration (mg/ml)

lation apparent et à l'apparition d'une bande diffuse migrant beaucoup moins vite que le tétramère sur les gels d'électrophorèse.

Il y aurait donc, bien que nous ayions travaillé en l'absence de cations divalents, une certaine proportion de l'enzyme n'ayant pas retrouvé sa structure native, mais cette proportion doit être faible et très polydisperse parce que nous n'avons pas pu la déceler par ultracentrifugation ; elle est sans doute constituée d'agrégats.

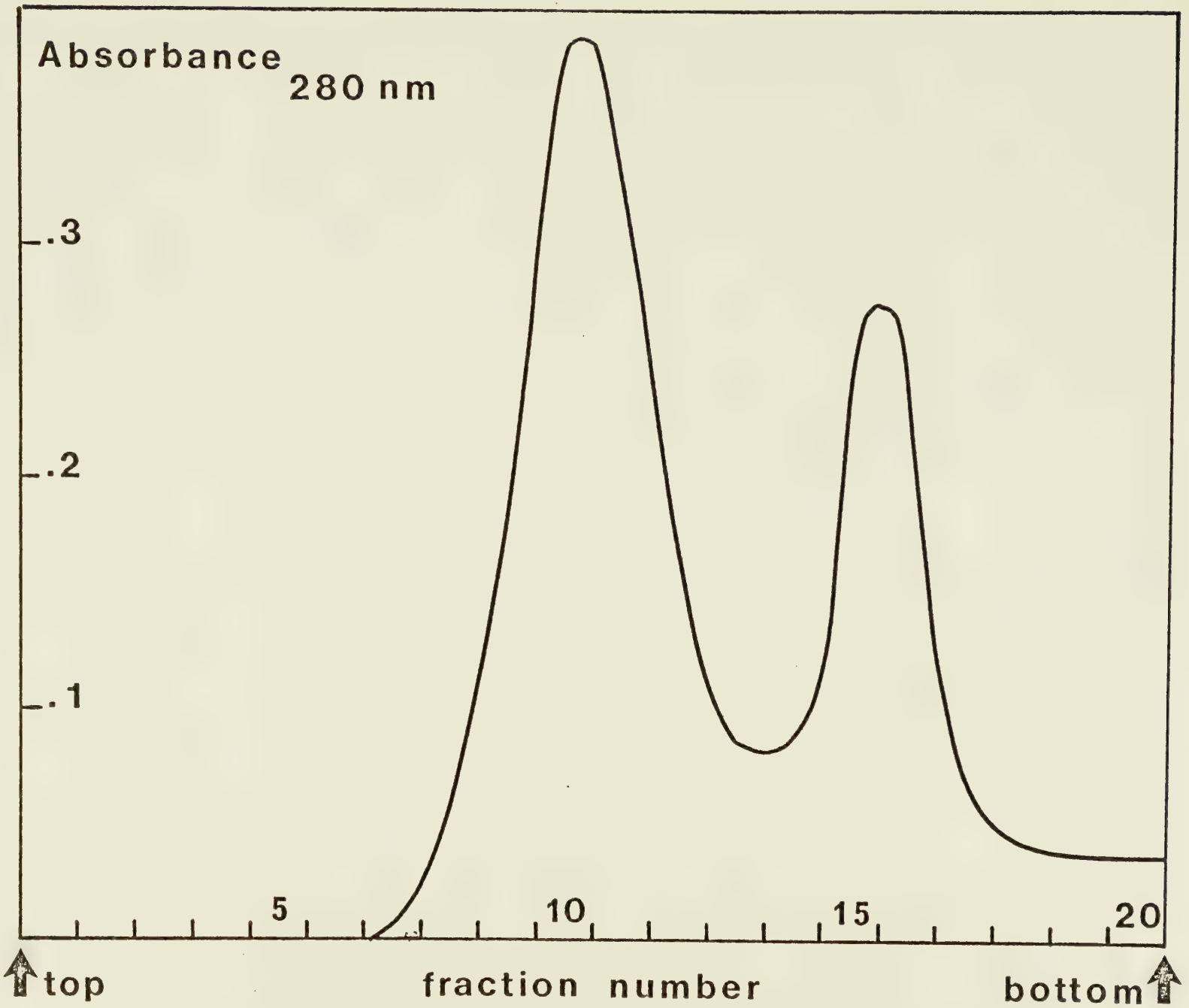
b. Gradient de sucrose

Etant donnés ces résultats, il fallait trouver une autre méthode qui nous permette d'isoler un tétramère pur avec 100% d'activité. Nous avons alors procédé à des centrifugations en gradient de sucrose (voir paragraphe II-3) ; ce type de centrifugation, appelé centrifugation zonale permet de séparer les macromolécules d'après leurs vitesses de sédimentation.

Comme on peut le voir sur la courbe d'absorbance (figure 3), cette technique permet de séparer la solution initiale d'enzyme en deux pics distincts ; au pic le plus léger correspond un enzyme d'activité maximum (100%) et donnant une seule bande en électrophorèse ; au pic le plus dense correspond un mélange de différentes formes de l'enzyme (au moins deux polymères supérieurs) avec une activité moindre (50 à 65% suivant les expériences).

Chapitre III - Figure 3 : Purification du tétramère par gradient de sucrose 10% - 30% (pour les conditions expérimentales, voir paragraphe II-3-b).

Sucrose gradient 10%–30%



IV - Etude de quelques structures

1) Tétramère

Avec la solution de tétramère isolé par gradient de sucrose, une première expérience de D.Q.E.L. a été réalisée; celle-ci a permis de déterminer, pour une concentration de 0,2 mg/ml, un coefficient de diffusion de translation $D_{20,W} = (3,00 \pm 0,15)\ 10^{-7}$ cm²/s, après correction de viscosité et de température (voir appendice). Mais, en fait, c'est la valeur à concentration nulle qui est intéressante.

Lors d'une nouvelle préparation d'enzyme, du tétramère pur (d'après les tests d'électrophorèse et d'ultracentrifugation) a été obtenu en quantité suffisante pour faire une étude en fonction de la concentration. La variation parfaitement linéaire des représentations semi-logarithmiques des courbes expérimentales (figure 4) prouve bien qu'il y a une seule forme d'enzyme dans la solution. L'extrapolation à concentration nulle, sur la figure 5, donne une valeur $D^\circ = 2,92\ 10^{-7}$ cm²/s, soit $D^\circ_{20,W} = (3,13 \pm 0,15)\ 10^{-7}$ cm²/s. Ce résultat est en parfait accord avec la valeur 3,12 F mesurée par Sund et Weber (1963) dans une cellule d'ultracentrifugeuse.

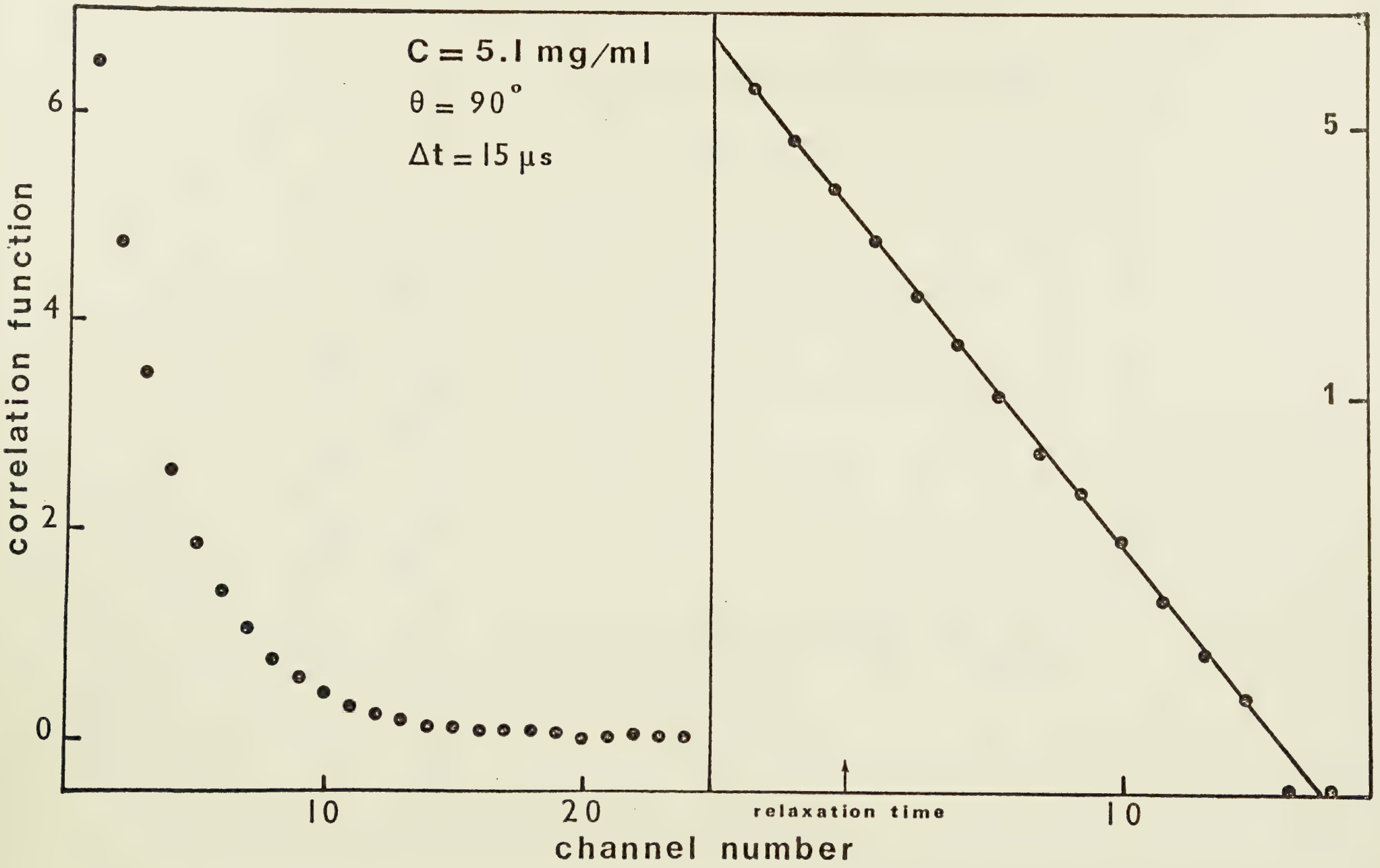
Essayons maintenant d'interpréter le résultat en terme de structure. Le coefficient de diffusion de translation d'une molécule est lié à la force de frottement subie par cette molécule lors de son déplacement dans un fluide ; ce coefficient dépend de plusieurs facteurs : le volume, la forme et la solvatation de la molécule (Tanford, 1961). Dans le cas de la β-galactosidase, si on prend comme hypothèses de calcul une masse moléculaire M = 540.000 (Craven etal., 1965) et un volume partiel spécifique $\bar{v} = 0,73$, calculé à partir de la composition en acides aminés, on peut calculer le coefficient D°_{max} correspondant au cas d'une sphère non hydratée :

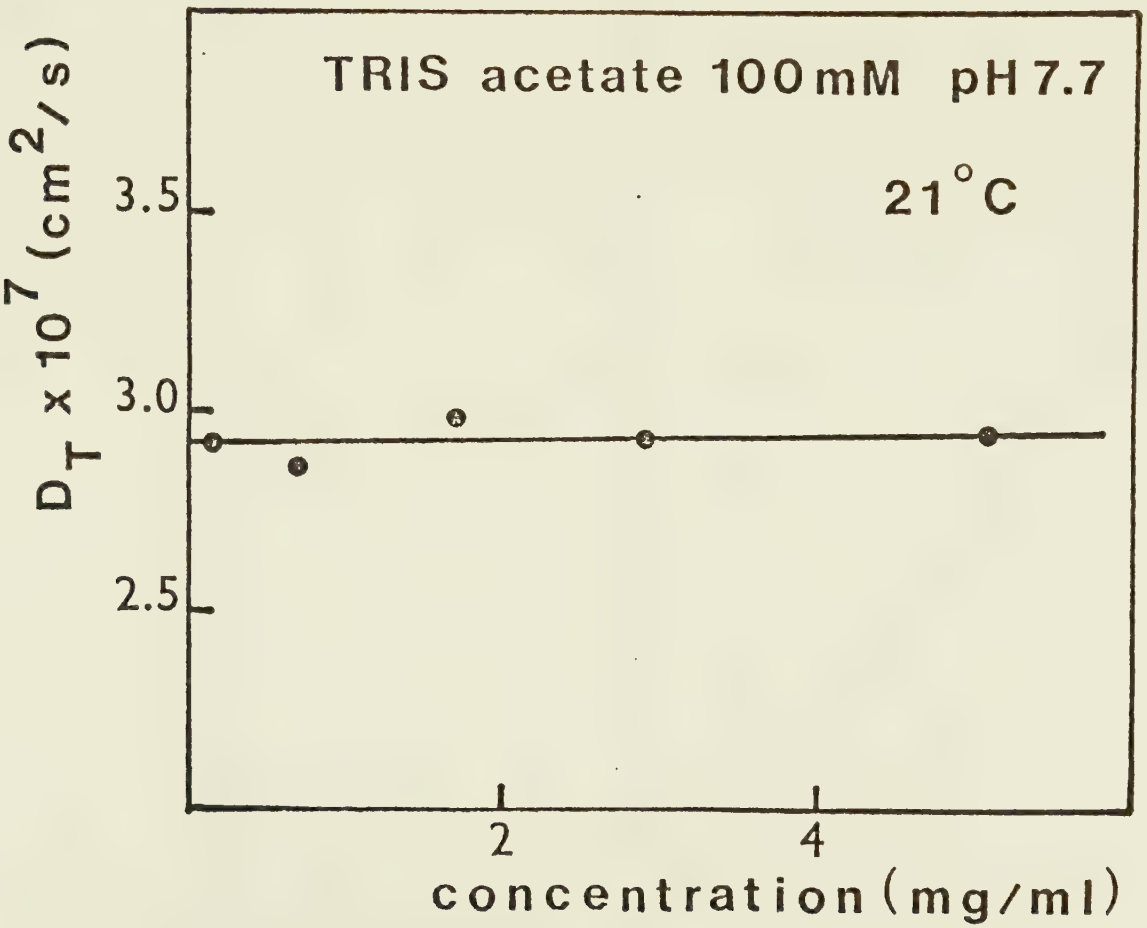
$$D^\circ_{max} = 3,98.10^{-7}\ \text{cm}^2/\text{s}$$

Le fait que $D^\circ_{20,W}$ soit inférieur à cette valeur, traduit à la fois la solvatation et la forme de la molécule. Pour une même molécule, la valeur de l'hydratation dépend de la technique utilisée pour la mesurer, et, dans le cas des méthodes hydrodynamiques, elle dépend du milieu et de la vitesse des molécules. Pour les protéines, les valeurs trouvées se situent en général dans l'intervalle [0,2 - 0,8 g d'eau/g de protéine] (Kuntz et Kauzmann, 1974).

Si nous assimilons ici l'enzyme à un ellipsoïde oblate avec une hydratation de 30%, la valeur de $D^\circ_{20,W}$ trouvée correspond à des dimensions de 140 Å et 70 Å respectivement pour le grand axe et le petit axe ; ces

Chapitre III - Figure 4 - Points expérimentaux pour une solution de tétramère.


C = 5.1 mg/ml
θ = 90°
Δt = 15 μs
correlation function
6
4
2
0
10
20
relaxation time
10
channel number
5
1


TRIS acetate 100mM pH 7.7
21°C
$D_T \times 10^7$ (cm^2/s)
3.5
3.0
2.5
2
4
concentration (mg/ml)

Chapitre III - Figure 5 : Coefficient de diffusion de translation pour le tétramère.

résultats sont compatibles avec les interprétations des clichés de microscopie électronique (Karlsson et al., 1964) d'après lesquelles les quatre sous-unités seraient disposées en forme de carré ou de losange dont les côtés mesureraient 115 Å environ.

2) Monomère

L'urée à forte concentration dissocie les protéines oligomériques et possède également la propriété de les dénaturer.

Après qu'une solution d'enzyme de 0,7 mg/ml, constituée de tétramère et de polymère, ait été dialysée contre une solution d'urée 8 M, une constante de diffusion de $8{,}45.10^{-8}$ cm²/s a été obtenue, soit, après correction : $D_{20,W} = 1{,}46.10^{-7}$ cm²/s.

Cette valeur peut sembler faible puisqu'on trouve dans la littérature $2{,}5.10^{-7}$ cm²/s pour le monomère alkylé par l'iodoacétamide en chlorure de guanidinium 5 mM (Wallenfels etal., 1963). Nous avons donc procédé à une ultracentrifugation ; un pic unique de coefficient de sédimentation 0,95 s, soit après correction (voir appendice) $s_{20,W} = 2{,}52$ s, a été trouvé.

A partir de ces deux valeurs, il a été possible de calculer la masse correspondante en utilisant la relation :

$$M = \frac{R\,T\,s}{D(1-\bar{v}\rho)}\ , \text{ où}$$

R est la constante des gaz parfaits,
T la température absolue,
$\bar{v}$ le volume partiel spécifique de l'enzyme,
ρ la masse volumique du solvant.

On trouve M ≃ 150 000, mais il est bien entendu que ce n'est qu'une valeur approchée puisqu'elle n'est pas calculée à partir des valeurs de s et D extrapolées à dilution infinie. Cette masse est tout à fait plausible pour le monomère puisque les valeurs déterminées par sédimentation à l'équilibre sont 118 000 (Shifrin, Steers, 1967) et 135 000 (Ullmann et al. 1968).

D'après ces résultats, tétramère et polymère sont constitués à partir de la même unité monomérique ; ce monomère, en solution dans l'urée 8 M, a une structure très fortement dépliée : en effet, alors que d'après le rapport des masses il devrait être 1,6 fois plus fort, on constate que ce coefficient de diffusion est deux fois plus faible que celui du tétramère.

3) Polymère supérieur

Une fois connus, le coefficient de diffusion de translation et la forme presque sphérique du tétramère, il devenait possible d'identifier le polymère supérieur présent dans le mélange étudié auparavant (figure 2).

En effet, on sait d'une part que l'intensité diffusée par une protéine de masse M_i, à la concentration C_i est proportionnelle au produit $C_i M_i$. D'autre part, pour des protéines spériques, le coefficient de diffusion de translation D_i varie comme $M_i^{-1/3}$

La fonction d'autocorrélation observée s'écrit alors, dans le cas d'un mélange de deux espèces (ici tétramère et polymère), :

$$C(\tau) = \left[C_1 M_1 e^{-K^2 D_1 \tau} + C_2 M_2 e^{-K^2 D_2 \tau} \right]^2 + A$$

$$= \left[C_1 M_1 e^{-K^2 D_1 \tau} + C_2 (i M_1) e^{-K^2 i^{-1/3} D_1 \tau} \right]^2 + A$$

avec i = 3/2 ou 2 suivant que le polymère est un hexamère ou un octamère. La seule inconnue dans cette fonction est i, puisque le coefficient de diffusion de translation du tétramère a été déterminé (paragraphe IV-1) et que les concentrations respectives des deux espèces peuvent être calculées à partir des clichés d'ultracentrifugation.

Deux méthodes distinctes ont été utilisées pour identifier le polymère supérieur : d'une part, une méthode de simulation, d'autre part, une méthode de régression linéaire.

- Nous avons simulé les deux fonctions d'autocorrélation correspondant, . soit à un mélange tétramère + héxamère,

.soit à un mélange tétramère + octamère. Nous avons ensuite, dans chacun des cas, déterminé le coefficient de diffusion apparent par la méthode itérative indiquée plus haut (chapitre II) et nous l'avons comparé à celui des courbes expérimentales (figure 2). C'est la simulation correspondant au mélange tétramère + octamère qui a donné la valeur la plus proche de la valeur expérimentale.

- Par une méthode de régression linéaire, nous avons analysé les fonctions d'autocorrélation expérimentales avec l'équation ci-dessus et comparé les variances obtenues pour les deux valeurs de i : 1,5 et 2. Pour toutes les fonctions d'autocorrélation correspondant aux différentes concentrations de la figure 2, c'est pour i = 2 que la variance est minimum.

Ces deux méthodes nous donnent donc des résultats concordants, à savoir que le premier polymère supérieur de la β-galactosidase est un octamère dont le coefficient de diffusion de translation vaut environ

$2,5.10^{-7}$ cm^2/s. Et ceci nous permet de penser que tous les polymères supérieurs de cet enzyme sont des multiples entiers du tétramère.

4) Effet du magnésium sur la structure

Lors de l'étude structurale d'un enzyme, la question primordiale que l'on se pose est de savoir si à un changement d'activité on peut associer un changement de conformation. Dans le cas de la β-galactosidase, on sait (Tenu et al., 1972) que l'activation par les ions Mg^{2+} est maximum à pH 7 pour une concentration de 1 mM. Il semblait donc intéressant d'observer par D.Q.E.L. un éventuel changement de conformation induit par la présence de Mg^{2+} 1mM.

Ce genre d'étude pouvait, à priori, être fait aussi bien sur le tétramère que sur un mélange de tétramère et de polymère. Nous avons donc repris les expériences relatées sur la figure 2(b), qui avaient été faites dans un milieu exempt de cations divalents (tampon T.V.N.S.), après avoir dialysé la solution d'enzyme contre un milieu T.E.S. 10 mM, NaCl 145 mM, $MgSO_4$ 1 mM, pH 7 ; la courbe expérimentale obtenue pour ce milieu (figure 2(a)) donne un résultat analogue à celui qui avait été obtenu en l'absence de cations divalents ; par conséquent , s'il y a un changement de conformation, il ne peut être que local et n'est pas décelable par D.Q.E.L. D'autres méthodes telles que spectrométrie de différence, dispersion optique rotatoires (Viratelle, 1976), fluorescence intrinsèque, dichroïsme circulaire (Strom et al., 1971), n'ont pas révélé non plus de changement de conformation visible en présence de Mg^{2+}.

5) Effet du pH

Une étude correcte de l'effet du pH n'a pas été possible, car, d'une part, quelque soit le pH, la solution d'enzyme n'était jamais rigoureusement monodisperse, d'autre part, il y avait un début de précipitation de l'enzyme dès que le pH devenait acide.

La fixation d'un inhibiteur compétitif (l'isopropyl thiogalactoside) au site actif de l'enzyme nous a cependant permis de constater que cette fixation entrainait une stabilisation partielle de l'enzyme vis-à-vis de la dénaturation acide. C'est généralement le cas des effecteurs d'enzyme.

V - Conclusion

Il semblerait que toutes les structures quaternaires observées pour la β-galactosidase sont constituées à partir de la même unité monomérique ; mais, du fait du grand nombre d'acides aminés qui le constituent, la séquence de ce monomère n'est pas encore déterminée ; on sait cependant qu'il comporte 19 cystéines, sans formation d'aucun pont disulfure (Craven et al. 1965).On pourrait penser à priori, que l'apparition de polymères supérieurs est due à la formation de ponts disulfures interchaines ; La présence d'un agent protecteur de SH, tel que le β-mercaptoéthanol ou le dithiothreitol n'en favorise pas la disparition. S'il y a des ponts disulfures, ils ne peuvent donc être que très enfouis puisqu'inaccessibles pour un agent réducteur.

On ne sait rien sur le type d'intéractions entre monomères qui maintiennent la structure tétramérique ; suivant qu'on les considère comme isologues ou hétérologues, il leur correspond un arrangement tétraédrique ou un arrangement carré (Klotz et al., 1970). Le fait que d'une part nous n'ayons pas pu mettre en évidence l'existence d'un dimère et que d'autre part le premier polymère supérieur soit un octamère, nous incite à penser que la géométrie du tétramère est une géométrie carrée. Il est, en effet, difficile d'envisager la polymérisation d'une structure à géométrie tétraédrique sans supposer un réarrangement structural important ; par contre, la formation de polymères à partir d'une structure à géométrie carrée est plus probable, elle implique seulement la formation d'un autre type d'interactions entre monomères pour expliquer la formation de polymères $(4N)_n$ à partir de la structure 4N. D'après nos constatations les fortes forces ioniques favoriseraient ce type d'agrégation.

Comment faire un parallèle entre les études de conformation et les études d'activité enzymatique. Des techniques comme l'ultracentrifugation analytique, la diffusion quasi élastique de la lumière, pour une analyse fine et précise, nécessitent des quantités d'enzyme importantes puisque les concentrations utilisées sont en général supérieures à 0,2 mg/ml, soit $1,5.10^{-6}$ M. Par contre, un test d'activité avec un substrat synthétique tel que l'O.N.P.G. se fait avec des concentrations d'enzyme de l'ordre de 5.10^{-9} M. Bien qu'entachées d'erreur quelques expériences de D.Q.E.L. à faible concentration d'enzyme ont été tentées ; il semblerait qu'il s'amorce alors une augmentation du coefficient de diffusion de translation, qu'on peut interpréter par un début de dissociation du tétramère. Pourquoi ne pas imaginer alors que la formation de tétramère n'est qu'une étape struc-

turale favorisée par certaines conditions de milieu et que l'enzyme (libre) peut exister sous forme de monomère à très faible concentration ?

Quoi qu'il en soit, des techniques comme la D.Q.E.L. ou l'ultracentrifugation ne permettent qu'une analyse globale de la structure de la molécule et c'est, sans doute, des approches chimiques qui permettront d'élucider la nature des interactions quaternaires et leur rôle.

A P P E N D I C E

Formules utilisées pour les corrections de viscosité et de température

$$D_{20,W} = D_{t,T} \cdot \frac{\eta_{t,T}}{\eta_{20,W}} \cdot \frac{293}{273 + t}$$

$$s_{20,W} = s_{t,T} \cdot \frac{\eta_{t,T}}{\eta_{20,W}} \cdot \frac{1 - \bar{v}_{20}\, \rho_{20,W}}{1 - \bar{v}_{t,T}\, \rho_{t,T}}$$

Valeurs adoptées pour les viscosités (cP) :

t	eau	T.R.I.S.acétate pH 7,7	T.E.S. 10 mM pH 7	T.V.N.S.	Urée 8M
20°C	1,005	1,10	1,12	1,05	1,79

pour le volume partiel spécifique : 0,73

pour l'indice de réfraction de l'urée 8M : 1,40

pour la densité de l'urée 8M : 1,12.

Les mesures de viscosité ont été effectuées avec l'aide de Monique Nicolas-Francillon, dans le groupe de R. Reich; je tiens à les remercier pour leur accueil.

VI - Références bibliographiques pour le chapitre III

APPEL, S.H., ALPERS, D.H., TOMKINS, G.M. (1965) - J. Mol Biol. 11,12

ARRIO, B. - Communication personnelle.

COHN, M. (1957) Bacteriol. Rev. 21, 1940.

CRAVEN, G.R., STEERS, E. ANFINSEN, C.B. (1965) - J. Biol. Chem. 240, 2468.

GOLDBERG, M.E. (1969) - J. Mol. Biol. 46,441.

KARLSSON, U., KOORAJIAN, S., ZABIN, I., SJÖSTRAND, F.S., MILLER, A. (1964) - J. Ultrastructure Res. 10,457.

KLOTZ, I.M., LANGERMAN, N.R., DARNALL, D.W. (1970) - Annual Review of Biochemistry 39, 25-62.

KUNTZ, I.D. KAUZMANN, W. (1974) - Advan. Protein Chem. vol.28,239-345.

LANGLEY, K.E., FOWLER, A.V., ZABIN,I. (1975) - J. Biol. Chem. 250, 2587-2592.

MARCHESI, S.L., STEERS, E., SHIFRIN, S. (1969) B.B.A. 181,20.

PERRIN, D. (1965) Thèse d'Etat.

SHIFRIN, S., STEERS, E. (1967) - B.B.A. 133,463.

STEERS, E., CRAVEN, G.R., ANFINSEN, C.B., BETHUNE, J.L. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2478.

STROM, R., ATTARDI, D.G., FORSEN, S., TURINI, P., CELADA, F., ANTONINI, E. (1971) - Eur. J. Biochem. 23, 118-124.

SUND, H., WEBER, K. (1963) - Biochem. Z., 337,24.

TANFORD, C. (1961). Physical Chemistry of macromolecules, Chapitre 6.

TENU, J.P., VIRATELLE, O.M., YON, J.M. (1972) - Eur. J. Biochem. 26, 112-118.

ULLMANN, A., GOLDBERG, M.E., PERRIN, D., MONOD, J. (1968) - Biochemistry 7,261.

ULLMANN, A., MONOD. J., (1969) B.B.R.C. 35,35.

VIRATELLE, O. (1976) - Thèse d'Etat.

VIRATELLE, O., YON, J. (1972) - Eur. J. Biochem. 33, 110-116.

WALLENFELS, K., SUND, M., WEBER, K. (1963). - Biochem. Z. 338,714

WALLENFELS, K., WEIL, R. (1971) - The enzymes, volume VII, third edition, P. BOYER ed.

WALLENFELS, K., ZARNITZ, M.L., LAULE, G., BENDER, M., KESER, M. (1959) Biochem. Z. 331, 459.

ZIPSER, D. (1963) - J. Mol. Biol. 7,113.

CHAPITRE IV

APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE DE POLYMERISATION LINEAIRE D'UN ENZYME : LA GLUTAMATE DESHYDROGENASE DE FOIE DE BOEUF.

Abréviations utilisées dans le chapitre IV

N.A.D.H. : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite.

N.A.D.P.H. : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite.

A.D.P. : Adenosine-5'-diphosphate.

G.T.P. : Guanosine-5'-triphosphate.

I - Introduction

La glutamate déshydrogénase catalyse réversiblement la réaction de désamination oxydative du L-glutamate en α-cétoglutarate en présence des coenzymes N.A.D.$^+$ ou N.A.D.P.$^+$:

glutamate + N.A.D.P.$^+$ + $H_2O \rightleftharpoons$ α- céłoglutarate + N.A.D.P.H. + H^+ + NH_4^+.

On sait que cet enzyme a la propriété de se polymériser in vitro et que le degré de polymérisation augmente avec la concentration (Eisenberg et Tomkins, 1968) ; l'oligomère obtenu à dilution infinie est constitué de six sous-unités identiques de masse moléculaire 56 000 (Eisenberg, 1971). L'intérêt porté pour cet enzyme réside dans l'existence d'une régulation des propriétés structurales et catalytiques par les coenzymes et par les effecteurs spécifiques A.D.P. et G.T.P. (Frieden, 1959). Un modèle de polymérisation linéaire indéfinie avec une constante d'équilibre indépendante de l'état de polymérisation (Dessen, 1973) permet d'expliquer les résultats expérimentaux observés en microscopie électronique (Josephs, 1971), dispersion optique rotatoire (Dessen et Pantaloni, 1969), polarisation de fluorescence (Malencik et Anderson, 1972), diffusion de la lumière (Chun et Kim, 1969), diffusion de rayons X aux petits angles (Sund et al., 1969), et technique de relaxation (Thusius et al., 1975).

Lorsque différents constituants sont présents dans la solution, la diffusion quasi élastique de la lumière permet de mesurer un coefficient de diffusion de translation moyen ; la variation de ce coefficient de diffusion a été étudiée expérimentalement en fonction de la concentration d'enzyme, en présence et en l'absence d'un effecteur, le G.T.P.. D'autre part, une simulation de la valeur de ce coefficient en fonction de la concentration d'enzyme a été effectuée, dans le cas d'un modèle de polymérisation linéaire avec constante d'association identique pour chaque étape ; la simulation a été faite pour plusieurs valeurs du rapport axial de l'oligomère et de la constante d'équilibre d'association. La comparaison entre les courbes simulées et la courbe expérimentale a permis de déterminer une valeur pour la constante d'équilibre d'association.

II - Article : J. Mol. Biol. (1976) 101, 397-416

Mechanism of Bovine Liver Glutamate Dehydrogenase Self-assembly

III.† Characterization of the Association–Dissociation Stoichiometry with Quasi-elastic Light Scattering

MAGALI JULLIEN AND DARWIN THUSIUS

Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire
Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay, France

(Received 12 June 1975, and in revised form 3 November 1975)

The homodyne light-scattering autocorrelation function originating in translational diffusion has been simulated for a polymerization model proposed for a number of self-associating systems: the sequential addition of identical monomer units to a growing aggregate, with identical equilibrium constants for each step. Both spherical and rigid rod structures have been considered. When applied to quasi-elastic light scattering data on glutamate dehydrogenase self-assembly, the simulation results indicate the formation of elongated polymers having equivalent and identical association sites. The weak response of translational diffusion coefficients to solution non-ideality leads to a valuable test of the unique equilibrium constant assumption. On the other hand, it is shown that successful exploitation of quasi-elastic light scattering data on aggregating systems of this type relies heavily on independent information.

1. Introduction

The molecular basis of protein self-assembly is receiving ever-increasing attention. Examples of the ability of simple monomeric components to spontaneously form large organized structures include the assembly of viruses, muscle filaments, flagella and microtubules. Notable among the simpler self-associating protein systems is bovine liver glutamate dehydrogenase. The early observation, that effector molecules known to modify GDH‡ enzymic activity also dramatically alter the state of protein aggregation, led to the hypothesis that self-assembly in this case is probably linked to a metabolic control mechanism (Frieden, 1963). This proposal is supported by the belief that GDH in liver cell mitochondria is present at concentrations where aggregation is known to occur readily *in vitro* (Eisenberg, 1971).

On the other hand, direct experimental evidence for an *in vivo* function has been lacking (Fisher, 1973). Glutamate dehydrogenase self-assembly nevertheless continues to serve as a valuable model for studying principles underlying the spontaneous formation of more complex structures having well-defined biological roles.

† Paper II in this series is Thusius (1975*a*).

‡ Abbreviations used: GDH, bovine liver glutamate dehydrogenase; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; GTP, guanosine 3′-triphosphate.

In this paper we probe the mode of GDH polymerization with quasi-elastic light scattering (light scattering correlation spectroscopy). This relatively new technique may be used for the rapid and precise determination of translational diffusion coefficients. An attractive feature of quasi-elastic light-scattering in regard to investigations of protein aggregation is that the diffusion coefficient of a macromolecule remains quite independent of concentration in conditions where the interpretation of many other physical properties (osmotic pressure, viscosity, total light-scattering intensity, sedimentation velocity) is ambiguous due to solution non-ideality. Our contribution includes a computer simulation treatment of the scattered light autocorrelation function for an unlimited linear polymerization, the results of which can be applied to other systems of self-associating macromolecules.

Shortly after we submitted this work for publication, Cohen *et al.* (1975) published a similar investigation, emphasizing the role of effector molecules in modulating GDH association–dissociation.

2. Materials and Methods

Bovine liver glutamate dehydrogenase was purchased from Boehringer as a crystalline suspension. Dialyses and concentration measurements were carried out as described earlier (Thusius *et al.*, 1975). All solutions were buffered with 0·2 M-phosphate (pH 7·2) and contained 0·001 M-EDTA. Just prior to light scattering experiments the protein solutions were centrifuged at 15,000 revs/min for 30 min†. Experimental temperatures were 21·5°C ±0·5°C.

Our 24-channel digital photon correlator was constructed by A.T.N. Electronique (Orsay, France). A brief description of this instrument is given elsewhere (Ribotta *et al.*, 1974); the optical system has been described by Jullien & Arrio (1975). The helium/neon laser source was either a Spectra Physics model 124 (15 mW) or model 125 (70 mW). Samples for light scattering measurements were placed in cylindrical Pyrex tubes having a 1-cm pathlength. Periodically we verified that our system reproduced the diffusion coefficient for Dow Chemical polystyrene latex spheres (0·109 μm diam.) to within 1 to 2%.

Corrections of diffusion coefficients to standard conditions (diffusion at 20°C in a solvent having the viscosity of water) were made with the formula (Pusey *et al.*, 1974)

$$D_{20,w} = (293.1/T)\,(\eta_{T,b}/\eta_{20,w})D_{T,b}, \qquad \text{(i)}$$

where $\eta_{T,b}$ is the viscosity of solvent at the experimental temperature, $\eta_{20,w}$ is the viscosity of water at 20°C and $D_{T,b}$ is the measured diffusion coefficient. For 0·2 M-phosphate (pH 7·2) at 21·5°C we find $\eta_{T,b}/\eta_{20,w} = 1{\cdot}09$. Viscosities were determined with a Contraves viscometer.

The index of refraction in equation (4) was taken to be 1·33.

We analyzed the autocorrelation data with an unweighted iterative least-squares routine which finds the "best" estimates of a, b and c in the equation

$$y(\tau) = a + be^{-c\tau}. \qquad \text{(ii)}$$

Data analyses and all simulations were realized with an IBM 370-168 system (CIRCE computer center, Orsay, France).

3. Theory

For detailed theoretical treatments of quasi-elastic light scattering and photon correlation techniques the reader is referred to comprehensive monographs and reviews (Benedek, 1969; Dubin, 1972; Cummins, 1974; Chu, 1974). In the following

† Control experiments indicated that Millipore filtration of protein solutions did not sensibly change the decay times.

paragraphs we recall pertinent principles and relate them to the interpretation of our experimental results.

The measured quantity in our single-clipped, homodyne correlation experiments is the photocurrent autocorrelation function, $C(\tau)$, which may be written as

$$C(\tau) = a + b|g^{(1)}(\tau)|^2. \tag{1}$$

Here a and b are instrument factors, $g^{(1)}(\tau)$ is the normalized autocorrelation function of the scattered field and τ is the delay time. For a collection of identical, non-interacting solute particles which are optically isotropic and small compared to the incident light wavelength, we have the simple exponential relation

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-\Gamma\tau}, \tag{2}$$

where the decay constant Γ is related to the translational diffusion constant D by

$$\Gamma = Dq^2, \tag{3}$$

q being the scattering vector

$$q = (4\pi n_0/\lambda_0)\sin\theta/2, \tag{4}$$

where n_0 is the solvent index of refraction, λ_0 is the incident light wavelength in vacuum and θ is the scattering angle. If the particles are spherically symmetric equation (2) is also valid when molecular dimensions are comparable to λ_0.

The autocorrelation function for large, non-spherical molecules may contain significant contributions from rotational diffusion. If the ratio L/λ_0 is not too large (L = particle length), the expression for monodisperse thin rods reduces to

$$g^{(1)}(\tau) = (B_0 e^{-\Gamma\tau} + B_2 e^{-(\Gamma + 6D_R)\tau})/(B_0 + B_2), \tag{5}$$

where D_R is the rotational diffusion coefficient. As qL approaches 0, B_0 approaches 1 and B_2 goes to 0 (Pecora, 1968; Cummins *et al.*, 1969). It will be noted that the conditions $qL \ll 1$ and/or $Dq^2 \gg 6D_R$ lead to the disappearance of the rotation term in equation (5). We add that a single decay with Γ as time constant will be measured even when $B_0 \sim B_2$, as long as $6D_R \gg \Gamma$ and $\tau \lesssim \cdot 1\Gamma^{-1}$. In this limit the correlator will essentially monitor only the variation in $C(\tau)$ arising from the slow, translational term.

Even dilute solutions of macromolecules exhibit deviations from ideal behaviour due to excluded volume effects or long-range solute–solute interactions. Experimental diffusion constants then become apparent values which in general are concentration dependent. The apparent diffusion coefficient for a system of identical molecules may be approximated by,

$$\begin{aligned} D &= D^0(1 + B'c) \\ B' &= 2MB - k, \qquad D^0 = \mathrm{k}T/f^0, \end{aligned} \tag{6}$$

where c is weight concentration, f is the frictional coefficient, T is absolute temperature, k is Boltzman's constant, M is molecular weight, B is the second virial coefficient in the expansion of the solution chemical potential, k is an empirical factor, and the superscript (0) denotes infinite dilution. Both experimental and theoretical evidence (Tanford, 1961; Carlson & Herbert, 1972; Cummins, 1974; Pusey, 1974; Altenberger & Deutch, 1973; Raj & Flygare, 1974) indicate that the quantities $2MB$ and k generally

tend to offset each other, resulting in a relatively small diffusion non-ideality term $B'c$.

We now consider a collection of particles of different size. If only translational diffusion contributes to the light scattering spectrum, the observed correlation function will contain N superimposed exponential decays, where N is the number of distinct species. For small particles, and in the absence of solute–solute interactions, the squared normalized field autocorrelation function is given by

$$|g^{(1)}(\tau)|^2 = |\sum_{i=1}^{N} \langle I_i \rangle e^{-\Gamma_i \tau} / \sum_{i=1}^{N} \langle I_i \rangle|^2, \tag{7}$$

where $\langle I_i \rangle$ is the time-averaged total light intensity scattered from species i; the decay constants in equation (7) are related to individual translational diffusion coefficients by

$$\Gamma_i = D_i q^2. \tag{8}$$

Although equation (7) also applies to heterogeneous mixtures of spherical molecules of arbitrary size, interference effects must be taken into account for large, non-spherical molecules. Neglecting rotational diffusion, the squared field autocorrelation function for non-interacting thin rods will have the following form

$$|g^{(1)}(\tau)|^2 = |\Sigma B_{0i} \langle I_i \rangle e^{-\Gamma_i \tau} / \Sigma B_{0i} \langle I_i \rangle|^2, \tag{9}$$

where the B_{0i} values are given by Pecora (1968).

In general, translational diffusion coefficients vary only gradually with molecular weight, and therefore the decay constants Γ_i of equation (7) will usually be closely spaced. It is of practical interest to treat a polydisperse system in terms of its mean diffusion coefficient, $\bar{D}$, defined as the following weighted average of the individual D_i values

$$\bar{D} = \sum_{i=1}^{N} \langle I_i \rangle D_i / \sum_{i=1}^{N} \langle I_i \rangle. \tag{10}$$

A number of authors have suggested numerical methods for the estimation of $\bar{D}$ from autocorrelation data (Koppel, 1972; Pusey, 1974; Schmitz & Pecora, 1975).

If the size of non-spherical scatterers is comparable to λ_0, the amplitudes of equation (7) will no longer be given by the limiting values at $qL = 0$, but will be replaced by apparent values, $\langle I_i \rangle_{app}$. However, for a narrow distribution of decay constants, the effects of even large modifications of the scattering amplitudes will tend to cancel when taking the ratio of equation (10), and $\bar{D}$ will therefore exhibit a relatively weak angular dependence.

The influence of non-ideality on the mean diffusion coefficient must also be considered. We have already noted that the diffusion virial term B' in monodisperse systems will often be negligible. The same type of compensation effect expressed formally in equation (6) is expected to obtain for the D_i term in polydisperse mixtures, but there appear to be few theoretical treatments of this more difficult problem. In contrast, scattering intensities (which are functions of colligative virial coefficients) can be strongly affected by non-ideal behaviour. However, using the reasoning of the above paragraph, we see that the occurrence of amplitudes in both the numerator and denominator of equation (10) will render the mean diffusion coefficient less responsive to thermodynamic non-ideality than the individual $\langle I_i \rangle$ values.

4. Computer Simulations

(a) *Thermodynamics of linear self-assembly*

We now consider a collection of polymer chains formed reversibly through an end-to-end aggregation of identical monomer units. If the association–dissociation rates are slow compared to molecular diffusion, the latter processes may be assumed to be decoupled from chemical bond formation, and we can treat the diffusion problem with the equations developed above for non-interacting polydisperse systems.

The simplest model for self-assembly of elongated macromolecules assumes identical equilibrium constants for all association–dissociation steps.

$$P_1 + P_i \rightleftharpoons P_{1+i}$$
$$i = 1, 2 \ldots \infty$$
$$K = \bar{P}_{i+1}/\bar{P}_i\bar{P}_1. \qquad \text{Scheme I}$$

The index i denotes the number of monomer units per polymer chain and the bars indicate molar equilibrium concentrations. It follows from the restriction of a unique equilibrium constant that self-association will continue without limit, or $N \to \infty$. This corresponds to the case of chain growth occurring *via* molecules possessing independent and identical association sites.

For a given equilibrium constant K, total solute concentration c_T, and monomer molecular weight M_1, the individual molar concentrations for scheme I are calculated from the monomer concentration (Thusius, 1975*a*),

$$\bar{P}_1 = [1 + 2c_TK/M_1 - (1 + 4c_TK/M_1)^{\frac{1}{2}}]/2c_TK(K/M_1), \qquad (11)$$

and the analytical expression for all remaining species:

$$\bar{P}_i = \bar{P}_1(\bar{P}_1K)^{i-1}, i > 1. \qquad (12)$$

(b) *Translational diffusion coefficient for rigid rods*

Mathematical models for hydrodynamic properties of non-spherical molecules are often developed in terms of ellipsoids of revolution (Tanford, 1961). If we assume that the self-assembly of scheme I involves the formation of rigid rods, to a first approximation it is reasonable to describe the reactants as prolate ellipsoids of revolution having axial ratios equal to

$$\rho_i = ib/a = i\rho_1, \qquad (13)$$

where a and b are, respectively, the minor and major half-axes of the monomer unit. From Perrin's equation (1936) for the frictional coefficient of a prolate ellipsoid we derive the following expression for the ratio between the diffusion coefficient of polymer P_i and that of monomer P_1:

$$D_i/D_1 = \frac{\sqrt{(1 - \rho_1^{-2})}\log[(1 + \sqrt{(1 - i^{-2}\rho_1^{-2})})/i^{-1}\rho_1^{-1}]}{i\sqrt{(1 - i^{-2}\rho_1^{-2})}\log[(1 + \sqrt{(1 - \rho_1^{-2})})/\rho_1^{-1}]}. \qquad (14)$$

Normalization with respect to D_1 gives a relation having a single adjustable parameter, ρ_1.

In Figure 1 we present D_i/D_1 ratios calculated with equation (14) for species up to P_{40}, assuming a monomer axial ratio of 1·5. Differences between successive diffusion coefficients $(D_i - D_{i+1})$ become progressively smaller with increasing chain length, leading to a continuous distribution for large values of i.

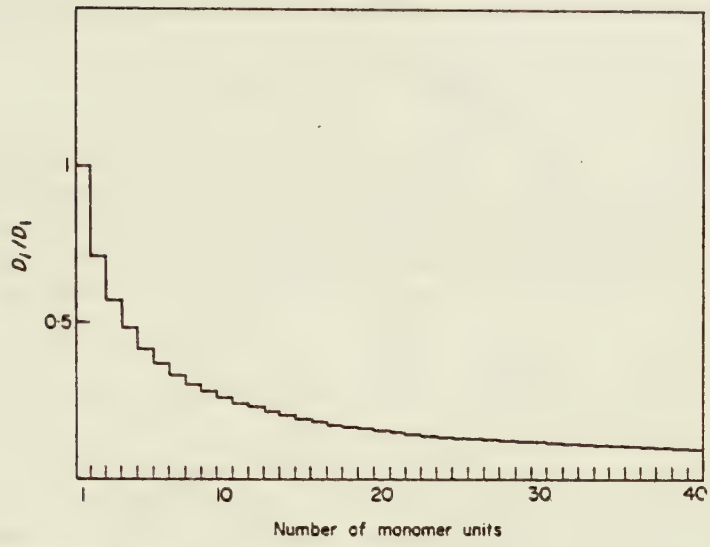


FIG. 1. Translational diffusion coefficients for prolate ellipsoids of revolution. Monomer axial ratio = 1·5.

(c) *Light scattering amplitudes*

The measured autocorrelation function $|g^{(1)}(\tau)|^2$ of a heterogeneous population depends on both scattering amplitudes and diffusion coefficients. From equation (7) it is clear that the intensity parameters of interest are the individual amplitudes normalized with respect to the total intensity. For non-interacting molecules small compared to the incident light wavelength, the time-averaged relative amplitudes for scheme I are given by

$$\langle I_i\rangle/\Sigma\langle I_i\rangle = \langle I_i\rangle/\langle I\rangle_{tot} = i^2\bar{P}_i/\Sigma i^2\bar{P}_i, \tag{15}$$

which assumes identical refractive index increments, $\delta n/\delta c$. We recall that equation (15) applies to any molecular form.

In regard to scheme I, it is convenient to discuss the extent of polymerization in terms of the dimensionless quantity $c_T K'$, where $K' = K/M_1$ is the association equilibrium constant normalized with respect to monomer molecular weight. Qualitatively, the limiting cases $c_T K' \ll 1$, $c_T K' \sim 1$ and $c_T K' \gg 1$ correspond to low, moderate and high degrees of association, respectively. Figures 2 and 3 illustrate the relative scattering amplitudes for scheme I as a function of $c_T K'$. Whereas in dilute solutions most of the light intensity originates in scattering from a few low molecular weight species, in concentrated solutions a broad amplitude distribution obtains, with contributions from a wide range of polymers. At $c_T K' = 7$ for example, the largest $\langle I_i\rangle$ term accounts for only 12% of the total radiation.

If the scatterer dimensions are comparable to the incident light wavelength λ_0, the expression of equation (15) must be modified to include interference effects. We can estimate the influence of particle length on the scattering spectrum by computing apparent intensities according to

$$\langle I_i\rangle_{app}/\Sigma\langle I_i\rangle_{app} = B_{0i}\langle I_i\rangle/\Sigma B_{0i}\langle I_i\rangle, \tag{16}$$

where $\langle I_i\rangle$ is the scattering amplitude of equation (15) and B_{0i} is the form factor

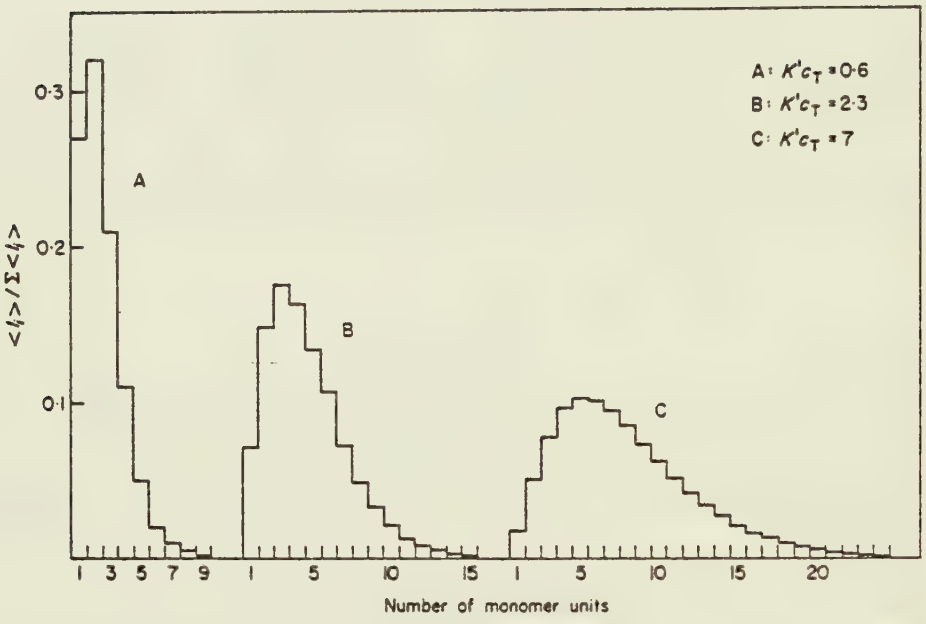


FIG. 2. Light scattering intensities for self-association characterized by a unique equilibrium constant.

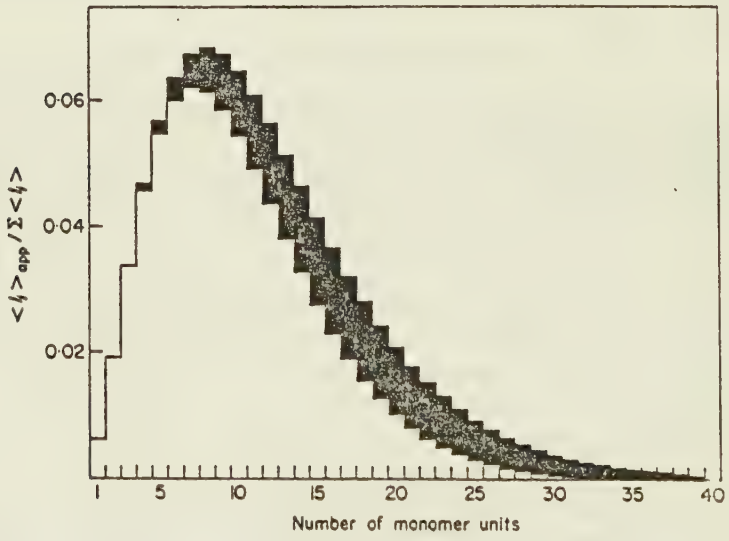


FIG. 3. Angular dependence of light scattering intensities for a self-associating system characterized by a unique equilibrium constant. Shaded areas denote differences between intensities at $\theta = 0°$ and $\theta = 180°$. In both cases $\langle I \rangle_{tot}$ refers to the zero angle value. $K'c_T = 16$; $\lambda_0 = 6328$ Å; monomer length = 100 Å.

for a thin rod made of i monomer units. It follows from Pecora's work (1968) that

$$B_{0i} = \left(\frac{2}{iLq} \int_0^{iLq/2} \frac{\sin v}{v} \mathrm{d}v \right)^2, \tag{17}$$

where v is a dummy integration variable. Choosing $L = 100$ Å, $\lambda_0 = 6328$ Å and the largest possible scattering angle, $\theta = 180°$, apparent relative intensities were computed with equations (16) and (17) for various $c_T K'$ values. The results for $c_T K' = 16$ are given in Figure 3. As expected, molecules containing more than four monomer units (i.e. $iLq \gtrsim 0{\cdot}1$) are less effective scatterers at 180° than in the limit $qL \to 0$.

(d) *Simulation of mean diffusion coefficients for linear self-assembly*

Using the definition of $\bar{D}$ given in equation (10) and the relations of equations (14) and (15), we can simulate mean diffusion coefficients normalized with respect to D_1 for reversible rod formation defined by a unique equilibrium constant. In the case of small, independent scatterers, $\bar{D}/D_1$ is a function of three adjustable quantities: the monomer axial ratio ρ_1, the weight concentration equilibrium constant K', and the total solute concentration c_T. The effect of these variables on the mean diffusion coefficient is given in Figure 4 for values of ρ_1, K' and c_T pertinent to GDH self-assembly. All simulations were carried out with $N = 40$. Control calculations demonstrated that increasing the number of species beyond this value does not change $\bar{D}$. Our results therefore accurately mimic the behaviour expected for $N \to \infty$.

The mean diffusion coefficient decreases monotonically with increasing degree of polymerization. The curvature of plots of $\bar{D}/D_1$ *versus* c_T depends on the monomer axial ratio and the association equilibrium constant; increasing either ρ_1 or K' results in smaller diffusion coefficients at a given concentration. Therefore, it would be difficult to extract the equilibrium constant from $\bar{D}$ without knowledge of the monomer

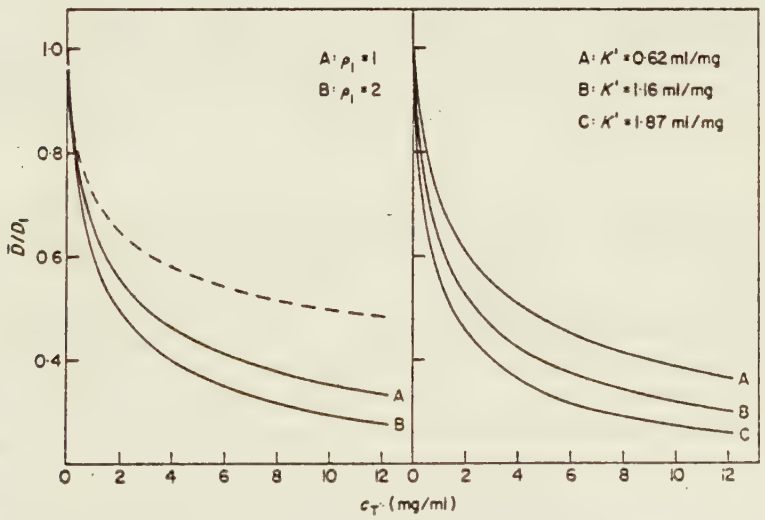


FIG. 4. Effect of monomer axial ratio and equilibrium constant on the mean translational diffusion coefficient for linear aggregation. Left: $K' = 1{\cdot}16$ ml/mg. The broken line represents spherical aggregation, calculated from $\bar{D} \propto \Sigma(\langle I_i \rangle / \langle I \rangle_{tot}) i^{-1/3}$. Right: $\rho_1 = 1{\cdot}5$.

axial ratio, or estimate the axial ratio without knowledge of the equilibrium constant. We have included in Figure 4 a simulation of spherical aggregates. The results illustrate that the translational diffusion coefficient of a sphere is always larger than for a prolate ellipsoid of equivalent volume (Tanford, 1961).

The above results refer to the condition $q(iL) \ll 1$. Due to unlimited chain growth in an open polymerization, we must consider the effect of scattering angle and incident light wavelength on the mean diffusion coefficient. It was noted earlier that although interference effects can appreciably modify the individual scattering amplitudes (Fig. 3), the angular dependence of $\bar{D}$ is expected to be moderate in view of compensations between the numerator and denominator of equation (10). For the conditions assumed in Figure 3, we find that in spite of the large effects on individual $\langle I_i \rangle$ terms, the mean diffusion coefficient computed at $\theta = 180°$ is only 10% smaller than in the limit $\theta = 0°$.

5. Experimental Results

(a) *Monomer diffusion coefficient*

Although one could in principle determine the diffusion coefficient of the GDH monomer by extrapolating mean diffusion coefficients to $c_T = 0$, this procedure is not very precise in practice, due to the rapid change of $\bar{D}$ at low protein concentration (Fig. 4). In the presence of GTP and NADPH, the association–dissociation equilibrium is displaced strongly to low molecular weight forms (Eisenberg & Tomkins, 1968). We therefore chose to estimate D_1 by measuring the scattered light autocorrelation functions of GDH solutions containing 2×10^{-3} M-GTP and 2×10^{-3} M-NADPH, with protein concentration varied between 1 and 4 mg/ml (Fig. 5). In order to reduce stray light and to decrease the time necessary to obtain acceptable decay curves, most determinations were carried out at $\theta = 90°$. The photocurrent autocorrelation function was accurately described by a single exponential. Visual extrapolation of the data in Figure 5 to infinite dilution gave $D_1 = 3{\cdot}4_3\ (\pm 0{\cdot}1)\times10^{-7}$ cm^2/s. These experiments were realized with an autocorrelator having delay channels for determining the asymptotes of the decay curves. However, as all other determinations were carried out before the delay channel option was available, we used the following indirect method for determining mean diffusion coefficients in the absence of dissociating ligands.

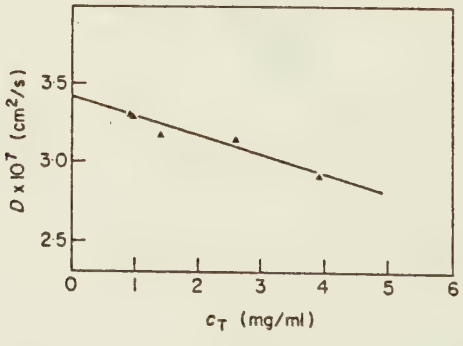


FIG. 5. Translational diffusion coefficients in the presence of 2 mM-GTP and 2 mM-NADPH. 0·2 M-phosphate (pH 7·2), 21·5°C.

(b) *Determination of mean diffusion coefficients*

Even in the absence of GTP and NADPH, semilogarithmic plots of $(C(\tau) - a)$ *versus* τ usually appeared linear up to $\gtrsim$90% of total decay. Figure 6 demonstrates excellent agreement between the observed time-dependent autocorrelation function and the theoretical plot obtained by force-fitting the data to a single exponential plus a time-independent "baseline".

The strictly linear nature of the replots can be rationalized with computer simulations based on scheme I. Classical light scattering experiments on GDH self-assembly in dilute solution give $K' \simeq 1{\cdot}1$ ml/mg at 22°C in 0·2 M-phosphate buffer (pH 7·2) (Thusius *et al.*, 1975). In addition, we may assume 1·5 as a working value for the monomer axial ratio (Pilz & Sund, 1971). After substituting the above estimate of K' into equations (11) and (12) (to calculate the relative scattering amplitudes of equation

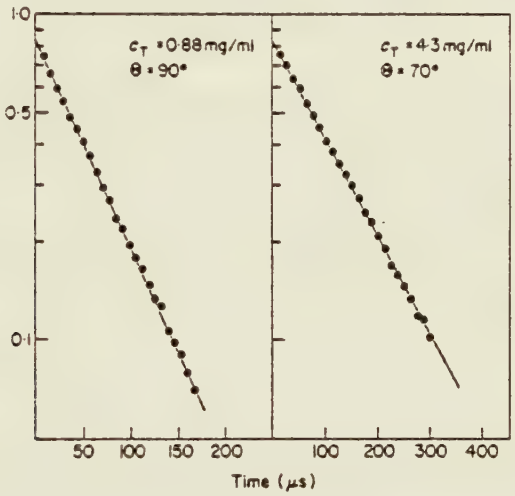


FIG. 6. First-order plots of photocurrent autocorrelation function. The lines were calculated from the least squares estimates of a, b and Γ obtained from a force-fit of the data to equations (1) and (2).

(15)), and substituting the experimental ρ_1 value into equation (14), we computed time-dependent decay curves for the field autocorrelation function by forming the squared exponential sum of equation (7), where now $\Gamma_i = D_i/D_1$. Figure 7 gives the result of a computer simulation for $c_T = 4$ mg/ml. In spite of the heterogeneous polymer distribution at this protein concentration, the predicted curve deviates only slightly from a single exponential. Experimental evidence for more than one decay therefore requires very precise estimates of the autocorrelation function at long times. Examination of Figure 7 reveals that increasing the baseline by 2% essentially eliminates curvature up to about four half-lives. Thus, force fitting the data to a single exponential will tend to give a least-squares asymptote slightly larger than the true value, producing an apparent linearity in replots of the original data.

Although a precise determination of the asymptote could be achieved by working with a longer delay time per channel (Δt), the scarcity of data at early times would

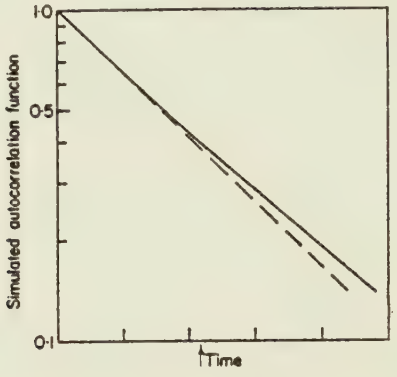


FIG. 7. Simulated autocorrelation function for scheme I. $K' = 1{\cdot}16$ ml/mg; $c_T = 4$ mg/ml; $\rho_1 = 1{\cdot}5$. For convenience the initial value of $|g^{(1)}(\tau)|^2$ has been set equal to unity. The broken line represents the initial slope, and the arrow indicates the position of the mean decay time, $1/\bar{\Gamma}$.

introduce uncertainties in the mean diffusion coefficient. Evidence for multi-exponential decay is illustrated in Figure 8, which shows that the diffusion coefficient obtained by force-fitting the data to a simple exponential increases systematically as Δt is decreased. Similar behaviour has been reported in quasi-elastic light scattering experiments of other polydisperse systems (Pusey, 1974).

Earlier in this paper we cited references to numerical methods for determining mean diffusion coefficients in correlation experiments. However, in view of limitations in our experimental technique (24-channel correlator; no delay channels), it does not appear likely that a more sophisticated numerical analysis would yield improved estimates of $\bar{D}$. We therefore decided to adjust the experimental decay constants with a model-dependent correction factor. Following the procedure outlined above for the simulation of the curve in Figure 7, we generated theoretical decays for the protein concentrations of our experiments. For a given value of c_T, 24 simulated ordinate values corresponding to the experimental sample times were fit to a single exponential with our non-linear regression routine. The decay constant computed in this way, $(\bar{D}/D_1)_{reg}$, was compared with the theoretical ratio $(\bar{D}/D_1)_{theor}$ calculated directly in

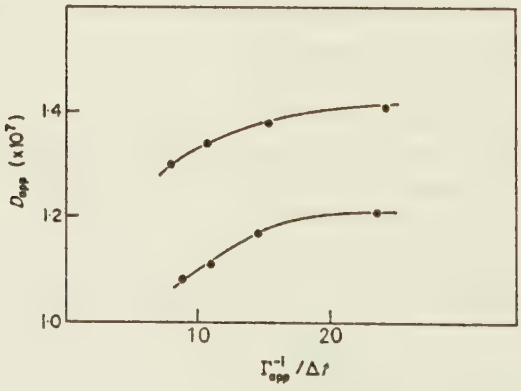


FIG. 8. Effect of sample time on force-fitted diffusion coefficients. Upper curve, $c_T = 4{\cdot}8$ mg/ml; lower curve, $c_T = 9{\cdot}6$ mg/ml.

the same simulation from the definition of equation (10). Finally, the experimental decay constant Γ_{app} was corrected using the relation

$$\bar{\Gamma} = \{(\bar{D}/D_1)_{theor}/(\bar{D}/D_1)_{reg}\}\Gamma_{app},$$
$$\bar{\Gamma} = f\Gamma_{app}. \qquad (18)$$

In Table 1 we present correction factors f as a function of protein concentration for the smallest ratio $\Gamma_{app}^{-1}/\Delta t$ used in our experiments. Consistent with an unlimited aggregation, the correction factor increases with c_T (i.e. with increased polydispersity). Admittedly the refinement of experimental decay constants adopted here is based on an assumed association–dissociation model. On the other hand, f is relatively insensitive to the parameters ρ_1 and K', and is in no case larger than 10%.

TABLE 1

Decay constant correction factors†

c_T	f
0·38	1·025
4·8	1·069
9·6	1·081
14·5	1·086

† $\Gamma_{app}^{-1}/\Delta t \simeq 8$

(c) *Angular dependence*

Decay constants evaluated by non-linear regression and corrected with equation (18) are given in Figure 9 as a function of $\sin^2\theta/2$. The linearity of the plots over a wide concentration range and the fact that the lines appear to pass through the origin indicate that rotation does not contribute significantly to the autocorrelation function in the conditions of the present experiments.

The same conclusion is suggested from a consideration of the rotational amplitude coefficients for thin rods given in equation (5) for monodisperse scatterers (Pecora, 1968; Cummins *et al.*, 1969). Assuming the wavelength and largest observation angle of Figure 9, and taking 130 Å as the approximate length of the GDH monomer (Pilz & Sund, 1971), it can be shown that B_2 for species up to the 20-mer is at least 50-fold smaller than the corresponding translational amplitude factor, B_0. In addition, the rotational diffusion coefficients of these particles are expected to be much larger than the translation diffusion coefficients. Therefore, to a good first approximation both criteria discussed under equation (5) for negligible rotational effects would appear to be satisfied.

6. Discussion

(a) *Previous equilibrium studies of glutamate dehydrogenase association–dissociation*

Olsen & Anfinsen (1952) made the original observation that beef liver glutamate dehydrogenase undergoes a reversible association–dissociation in the milligram per milliliter range. Over the years a large number of conflicting reports have appeared

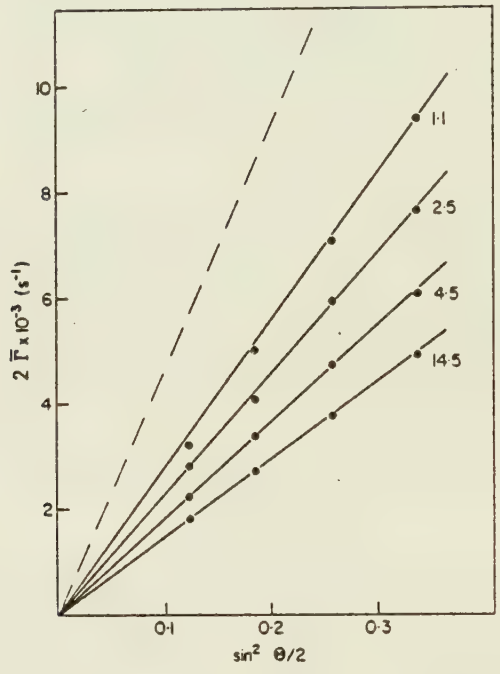


FIG. 9. Angular dependence of measured decay constants. The scattering angles are 41°, 51°, 61° and 71°. Total protein concentrations in mg/ml are given in the Figure. The broken line was calculated from the estimate of D_1 in Fig. 5. Experiments not included in the Figure show that the angular dependence is linear up to at least $\theta = 90°$ for $c_T < 10$ mg/ml, 0·2 M-phosphate (pH 7·2), 21·5°C.

on the actual mode of aggregation. Following improvements in enzyme purification, the determination of precise molecular weights in a wide protein concentration range and the publication of structural and kinetic results, a coherent picture of GDH self-assembly is beginning to emerge (Eisenberg *et al.*, 1975; Sund *et al.*, 1975; Thusius, 1976). Taken together, the results of diverse physical chemical measurements are consistent with formation of rod-like molecules of indefinite length. The smallest molecular unit participating in the reversible aggregation is composed of six apparently identical polypeptide chains with molecular weights equal to 56,000 (Landon *et al.*, 1971). Further dissociation occurs only under extreme conditions. We shall refer to the intact molecule of six subunits as the GDH monomer, although in the literature the terms hexamer and oligomer have also been used.

In regard to the thermodynamics of aggregation, early optical rotation data were interpreted in terms of a stepwise association of monomers with nearly identical equilibrium constants for each step (Dessen & Pantaloni, 1969). Assuming the limiting case of a *unique* equilibrium constant and unlimited chain growth, Eisenberg and co-workers (Reisler *et al.*, 1970; Eisenberg, 1971; Reisler & Eisenberg, 1971) and Sund and co-workers (Markau *et al.*, 1971; Gauper *et al.*, 1974; Sund *et al.*, 1972) have demonstrated that concentration-dependent molecular weights of *dilute* GDH solutions can be rationalized with scheme I.

Without further assumptions however, scheme I cannot account for molecular weight behaviour above ~2 mg/ml. Chun *et al.* (1972) and Markau *et al.* (1971) have

successfully fitted light scattering molecular weights at higher protein concentrations with the following relation (or an equivalent form):

$$\mathcal{M}_w^{app} = \mathcal{M}_w^0/(1 + 2B\mathcal{M}_w^0 c_T), \tag{19}$$

where $\mathcal{M}_w^{app}$ is the experimental weight average molecular weight, $\mathcal{M}_w^0$ is the theoretical value predicted for scheme I, and B is a virial coefficient. While it seems quite certain that GDH solutions are non-ideal above about 10 mg/ml, Reisler & Eisenberg (1971) and Reisler *et al.* (1970) have stressed that there is no firm theoretical justification for assuming a unique, concentration-independent virial coefficient at low and intermediate concentrations. It has been added (Thusius, 1976) that since $\mathcal{M}_w^{app}$ in the above expression is determined entirely by Bc_T at high protein concentration, the experimental molecular weights must necessarily become independent of polymer distribution. Therefore, a quantitative fitting of $\mathcal{M}_w^{app}$ to equation (19) is not compelling evidence for a sequential polymerization with equilibrium constants strictly independent of chain length.

(b) *Quasi-elastic light scattering applied to glutamate dehydrogenase self-assembly*

Light scattering correlation spectroscopy provides a new and independent means of probing the mode of GDH self-assembly through the rapid and precise determination of translational diffusion coefficients. In contrast to molecular weights, translational diffusion coefficients are functions of both molecular size and shape. Consequently, the concentration dependence of the mean diffusion coefficient for a self-associating system can lead to a distinction between spherically symmetric aggregation and polymerization in one dimension (Fig. 4). While viscosities allow one to distinguish qualitatively between these two models (Reisler & Eisenberg, 1970), the quantitative interpretation of viscosity data for oligomeric systems is ambiguous except in very dilute solutions (Reisler & Eisenberg, 1970).

The angular dependence of scattered light is also a probe of molecular geometry. Although classical light scattering studies of GDH solutions indicate the formation of elongated structures (Eisenberg & Tomkins, 1968; Markau *et al.*, 1971), the estimated distribution of rod lengths does not agree with small-angle X-ray measurements (Eisenberg, 1971; Eisenberg & Reisler, 1971; Markau *et al.*, 1971). This discrepancy has been attributed to inhomogeneous mass distribution in the protein chains (Markau *et al.*, 1971; Eisenberg & Reisler, 1971), possibly arising from voids postulated in a physical model of the GDH monomer (Reisler & Eisenberg, 1970). The presence of voids is, however, a subtle structural feature which apparently does not significantly modify translational diffusion coefficient values (Reisler *et al.*, 1970). In contrast to classical light scattering measurements, we may study the chain length equilibrium distribution by quasi-elastic light scattering without having to define the precise mass distribution of our model.

Finally, it is known that translational diffusion coefficients of monodisperse macromolecules can be quite insensitive to concentration. This circumstance arises from a fortunate cancellation of terms (eqn (6)) leading to effective diffusion virial coefficients which are considerably smaller than the colligative virial coefficient which figures in molecular weight determinations. Thus at concentrations where the colligative molecular weight of a large solute molecule deviates from its true value, the experimental diffusion coefficient tends to remain essentially constant. Regarding polydisperse, self-associating systems, we may therefore expect that in some cases the

mean diffusion coefficient can provide a less ambiguous test of reaction stoichiometry than sedimentation equilibrium or classical light scattering measurements.

(c) *Diffusion coefficient concentration dependence*

In the presence of GTP and NADPH, glutamate dehydrogenase translational diffusion coefficients decrease monotonically with increased protein concentration (Fig. 5). This is consistent with the results of early molecular weight studies (Eisenberg & Tomkins, 1968), which show that millimolar concentrations of GTP and NADH in 0·2 M-phosphate do not provoke a complete dissociation to monomer units.

As ligand binding does not appear to modify GDH diffusion properties (Sund *et al.*, 1972; Markau *et al.*, 1971), extrapolation of the data in Figure 5 to $c_T = 0$ should yield an estimate of the monomer diffusion coefficient, D_1. Correction to standard conditions gives $(D_1)_{20,w} = 3{\cdot}7\ (\pm 0{\cdot}1) \times 10^{-7}$ cm^2/s. This result is 2 to 5% higher than the values found by molecular sieve chromatography (Chun & King, 1969), equilibrium sedimentation (Markau *et al.*, 1971), and settling experiments on macroscopic models of the GDH monomer (Reisler *et al.*, 1970), and 8% lower than the value recently reported by Cohen *et al.* (1975), using quasi-elastic light scattering.

In the absence of effectors, the mean diffusion coefficient decreases non-linearly with c_T, in qualitative accord with the behaviour expected for an open polymerization defined by a unique equilibrium constant. Our quantitative fitting of these data to scheme I assumes a physical model based on the careful low-angle X-ray scattering investigations of Sund *et al.* (1969) and Pilz & Sund (1971). These authors describe the GDH monomer as a "rounded cylinder" with a length:diameter ratio of 1·5. This value was introduced in the computation of data analysis correction factors (Table 1), where only an approximate ratio was required. In rationalizing the mean diffusion coefficient concentration dependence we use a refined value for ρ_1, founded on the usual assumption that the hydrodynamic properties of a cylinder having a length: diameter ratio L/d are equivalent to those of a prolate ellipsoid having an axial ratio given by (Tanford, 1961).

$$b/a = (2/3)^{\frac{1}{2}} L/d. \tag{20}$$

The simulation of $\bar{D}$ for rigid rod formation occurring *via* scheme I should then be based on a monomer axial ratio of 1·21. Assuming this value for ρ_1, we simulated the ratio $\bar{D}/D_1$ as a function of c_T for different K' values and compared the theoretical behaviour with the experimental mean diffusion coefficients normalized with respect to the monomer diffusion coefficient estimated from the data of Figure 5. Figure 10 shows acceptable agreement up to ~7 mg/ml for $K' = 1{\cdot}4$ ml/mg. The same value is derived from the work of Chun *et al.* (1972), after correction to the temperature of our experiments (Reisler & Eisenberg, 1971; Thusius *et al.*, 1975) and normalization to a monomer molecular weight of 336,000 (Landon *et al.*, 1971)†.

Referring to the simulated curves of Figure 4, it is clear that our results argue against an aggregation in which spherical symmetry is maintained. Even for $\rho_1 = 1$, $\bar{D}$ for the two models differ significantly at a given solute concentration. By measuring the fluorescence polarization of a probe covalently bound to GDH, Malencik & Anderson (1972) have also attempted to distinguish between spherical and linear

† Other estimates of K' for our experimental conditions are 2·0 ml/mg (Reisler *et al.*, 1970) and 1·1 ml/mg (Thusius *et al.*, 1975). The estimate of Chun *et al.* (1972) is probably the most accurate, since it is based on data obtained in a wide protein concentration range (Eisenberg & Tomkins, 1968), and takes into account non-ideality.

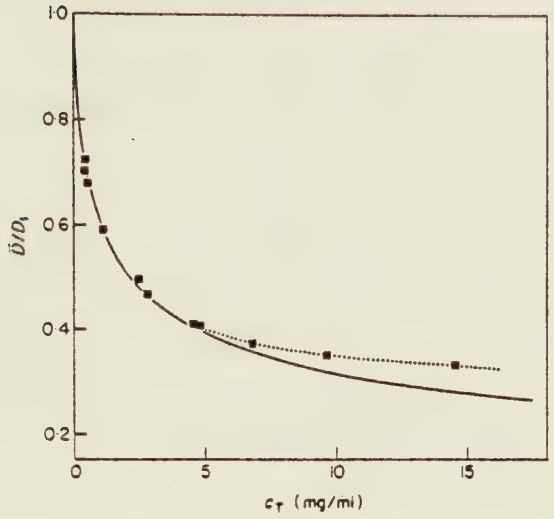


FIG. 10. Mean translational diffusion coefficients for GDH self-assembly. The lines are theoretical. (————) Ideal solutions; (· · · · ·) non-ideal solutions.

association–dissociation. These earlier data tend to confirm linear structures, but in the protein concentration range investigated ($c_T < 1$ mg/ml), the fluorescence polarization predicted for the two models differs at most by 1%. Other solution data pointing to linear self-assembly are the angular dependence of scattered light (Eisenberg & Tomkins, 1968; Eisenberg & Reisler, 1970; Markau *et al.*, 1971), intrinsic viscosities (Reisler & Eisenberg, 1970) and low angle X-ray scattering (Sund *et al.*, 1969; Pilz & Sund, 1971). In these studies a quantitative fitting of the data to scheme I was either not attempted or rendered difficult due to solution non-ideality and inhomogeneous mass distribution in the polymer chains. The translational diffusion coefficient results therefore lend strong independent support to rigid rod formation defined by a single equilibrium constant.

A comparison of the experimental mean diffusion coefficients with simulated parameters assumes that the chemical reactions leading to protein–protein bond formation are much slower than the translational diffusion processes. It seems rather certain that this condition is in fact satisfied. Temperature-jump experiments (Thusius *et al.*, 1975) have shown that the half-life for the reversible association–dissociation is less than 20 milliseconds in the conditions of the present experiments; this is 70 times longer than the slowest half-life implied in Figure 9. Another indication that diffusion is decoupled from chemical bond formation is the fact that the plots of Figure 9 do not display significant intercepts at zero angle (Chu, 1974).

We must also ask to what extent polymer chain length and finite observation angles could modify the light scattering spectrum. In the computer simulation work we outlined the calculation of mean translational diffusion coefficients which takes into account the unlimited size of rigid rods formed in an open polymerization. It was shown that for thin rods (assuming the approximate length of the GDH monomer), the angular dependence of $\bar{D}$ is small, but non-negligible for $c_T K' = 16$ and $\theta = 180°$

(Fig. 3). Repeating these computations, but for $\theta = 90°$, we conclude that for the observation angles and protein concentrations of our experiments, the mean diffusion coefficient will differ from its limiting value at zero angle by no more than 1·5%. The linearity of the plots in Figure 9 is therefore in accord with scheme I and our present knowledge of GDH structure.

(d) *Rationalization of diffusion coefficients at high protein concentrations*

Above 7 mg/ml, $\bar{D}/D_1$ is systematically larger than predicted for scheme I. This behaviour can be attributed to solution non-ideality and coupling between concentration gradients (Appendix). The dotted line in Figure 10 demonstrates that simulating mean diffusion coefficients with equation (A7) ($k^*/s_1 = 0{\cdot}060$ ml/mg) allows us to accurately rationalize the quasi-elastic light scattering data over the entire protein range investigated. Since the solubility of GDH in 0·2 M-phosphate is about 15 mg/ml, testing our model at higher c_T values was not feasible.

TABLE 2

Departures of weight average molecular weights, weight average sedimentation coefficients and mean diffusion coefficients from their ideal values

c_T	$\bar{M}_w^{app}/\bar{M}_w^0$†	S_w^{app}/S_w^0‡	D^{app}/D^0§
1	1·02	1·00	0·98
5	0·86	0·86	1·00
10	0·69	0·74	1·07
15	0·55	0·63	1·14

† Calculated from equation (19), assuming $K' = 1{\cdot}1$ ml/mg, $M_1 = 3{\cdot}36 \times 10^5$, $B = 1 \times 10^{-5}$ mol ml/g^2.

‡ Calculated from the entries of the first and third columns with $S_w^{app}/S_w^0 = (\bar{M}_w^{app}/\bar{M}_w^0)\,(\bar{D}^{app}/\bar{D}^0)$.

§ Calculated from equation (A7), assuming the average molecular weights of the first column, the theoretical $\bar{D}/D_1$ of Fig. 10, and $(k^*/S_1) = 0{\cdot}06$ ml/mg.

In contrast to the small (<15%) departures from ideal behaviour observed in Figure 10, there are large differences between theoretical and experimental total scattered light intensities. It is known that light scattering molecular weights level off at ~10 mg/ml and decrease at higher concentrations (Markau *et al.*, 1971; Gauper *et al.*, 1974; Ifflaender *et al.*, 1975). A similar situation obtains for sedimentation coefficients, which reach a maximum at 3 to 5 mg/ml (Reisler *et al.*, 1970; Ifflaender *et al.*, 1975). These concentration effects are illustrated in Table 2, where we compare apparent and ideal molecular weights, sedimentation coefficients and translational diffusion coefficients, for GDH self-assembly. In view of the weak response of $\bar{D}/D_1$ to solution non-ideality, the present results constitute an independent test of scheme I at intermediate and high protein concentrations.

(e) *The mechanism of glutamate dehydrogenase self-assembly*

Finally, we wish to emphasize that scheme I represents the *stoichiometry* of GDH association–dissociation, and not necessarily the actual reaction *mechanism*. Our autocorrelation experiments have not probed the microscopic paths leading to polymer

formation, but only the distribution and shape of GDH particles. In fact, recent kinetic evidence (Thusius *et al.*, 1975; Thusius, 1975*a*,*b*) appears to exclude chain elongation occurring uniquely *via* a sequential addition of monomer units, as represented in scheme I. Rather, the association–dissociation rates are consistent with a random aggregation in which reactions occur between all polymerized forms of the monomer according to Thusius *et al.* (1975).

$$P_i + P_j \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} P_{i+j}, \qquad \text{Scheme II}$$

$$i, j = 1, 2 \ldots \infty.$$

APPENDIX

Correction of mean diffusion coefficients at high protein concentrations

The translational diffusion coefficient, molecular weight and sedimentation coefficient of a macromolecule are related by the well-known equation (Tanford, 1961)

$$D = \frac{RT}{1 - \rho\phi} \frac{S}{M}, \tag{A1}$$

where ρ is solution density and ϕ is partial specific volume. The ideal mean diffusion coefficient of a self-associating system can be expressed as

$$\bar{D}^0 = \frac{\Sigma c_i M_i D_i}{\Sigma c_i M_i}, \tag{A2}$$

where the c_i terms are equilibrium weight concentrations. Recognizing that in dilute solutions the weight average sedimentation coefficient is given by

$$\bar{S}^0_w = \frac{\Sigma c_i S_i}{c_T}, \tag{A3}$$

and recalling the expression for the ideal weight average molecular weight, we may rearrange equation (A2) to the following form

$$\bar{D}^0 = \frac{RT}{1 - \rho\phi} \frac{\bar{S}^0_w}{\bar{M}^0_w}. \tag{A4}$$

In deriving this relation it is assumed that ϕ is identical for all species. Interestingly, the weight averages of S_i and M_i do not yield the weight average diffusion coefficient, but rather the mean parameter, $\bar{D}^0$.

Due to concentration effects, the mean diffusion coefficient will in general be an apparent value, related to the apparent weight average sedimentation coefficient and weight average molecular weight.

$$\bar{D}^{app} = \frac{RT}{1 - \rho\phi} \frac{\bar{S}^{app}_w}{\bar{M}^{app}_w}. \tag{A5}$$

In the case of GDH self-assembly, it is known that $\bar{M}^{app}_w$ is given to a good approximation by equation (19) (Markau *et al.*, 1971; Chun *et al.*, 1972). More recently, Ifflaender

et al. (1975) have shown that GDH sedimentation coefficients above several milligrams per milliliter can be rationalized with scheme I by assuming the relation

$$\bar{S}_w^{app} = \bar{S}_w^0 - k^* c_T, \tag{A6}$$

where k^* is an empirical constant arising from thermodynamic non-ideality and viscosity effects. Substitution of equations (19), (A4) and (A6) into (A5), followed by normalization with respect to monomer parameters and rearrangement, finally gives

$$\bar{D}^{app}/D_1 = (\bar{D}^0/D_1)\frac{1 - (k^*/S_1(\bar{D}^0/D_1)(\bar{M}_w^0/M_1))c_T}{1/(1 + 2B\bar{M}_w^0 c_T)}. \tag{A7}$$

We recall that for scheme I, $\bar{D}^0/D_1$ and $\bar{M}_w^0/M_1$ are given in equations (10), (14) and (19).

Since the parameters K, M_1, ρ_1 and B are known from independent experiments, the above derivation implies that a satisfactory fitting of the diffusion coefficient concentration dependence can be achieved by simply varying the quantity k^*/S_1. Figure 10 shows that this is in fact the case; the dotted line has been calculated from equation (A7), assuming $k^*/S_1 = 0{\cdot}06$ ml/mg. Taking 13 S for the monomer sedimentation coefficient (Sund *et al.*, 1972; Dessen, 1974), 0·78 is found for k^*. This is not far from the value 0·7 used by Ifflaender *et al.* (1975) in their fitting of GDH sedimentation coefficients at 10°C in 0·06 M-phosphate.

We are grateful to Professor J. Yon for her interest in quasi-elastic light scattering and criticisms of the manuscript. This work received material support from Professor Yon (Délégation Générale de la Recherche Scientifique et Technique, Convention 72 7 0494) and Dr G. Durand (Laboratoire de Physique des Solides, Orsay). We also thank Dr B. Arrio for his early participation in realizing the light scattering apparatus, Drs M. Iwatsubo and J. M. Jallon for a gift of GDH, Dr R. Jullien for writing the least-squares program, Dr Y. Galerne for helpful discussions, M. J. Lavorel for technical assistance and Dr Cohen and Professor Benedek for kindly communicating results prior to publication.

REFERENCES

Altenberger, A. R. & Deutch, J. M. (1973). *J. Chem. Phys.* **59**, 894–898.

Benedek, G. B. (1969). In *Polarisation, Matière et Rayonnement*, pp. 49–84, Presses Universitaires de France, Paris.

Carlson, F. D. & Herbert, T. J. (1972). *J. de Phys.* **33-C 1**, 157–161.

Chu, B. (1974). In *Laser Light Scattering*, pp. 201–270, Academic Press, New York.

Chun, P. W. & Kim, S. J. (1969). *Biochemistry*, **8**, 1633–1643.

Chun, P. W., Kim, S. J., Williams, J. D., Cope, W. T., Tung, L. H. & Adams, E. T. (1972). *Biopolymers*, **11**, 197–214.

Cohen, R. J., Jedziniak, J. A. & Benedek, G. B. (1975). *Proc. Roy. Soc. London*, **345**, 73–88.

Cummins, H. Z. (1974). In *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy* (Cummins, H. Z. & Pike, E. R., eds), pp. 285–330, Plenum Press, New York.

Cummins, H. Z., Carlson, F. D., Herbert, T. J. & Woods, G. (1969). *Biophys. J.* **9**, 518–546.

Dessen, P. (1974). Doctoral Thesis, Université de Paris-Sud, Orsay, France.

Dessen, P. & Pantaloni, D. (1969). *Eur. J. Biochem.* **8**, 292–302.

Dubin, S. B. (1972). In *Methods in Enzymology* (Hirs, C. M. W. & Timasheff, S. N. eds), vol. **26**, part C, pp. 119–174, Academic Press, New York.

Eisenberg, H. (1971). *Account Chem. Res.* **4**, 379–385.

Eisenberg, H. & Reisler, E. (1970). *Biopolymers*, **10**, 2363–2376.

Eisenberg, H. & Tomkins, G. M. (1968). *J. Mol. Biol.* **31**, 37–49.

Eisenberg, H., Josephs, R. & Reisler, E. (1975). *Advan. Protein Chem.* In the press.

Fisher, H. F. (1973). *Advan. Enzymol.* **39**, 369–417.
Frieden, C. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 3286–3299.
Gauper, F. P., Markau, K. & Sund, H. (1974). *Eur. J. Biochem.* **49**, 555–563.
Ifflaender, U., Markau, K. & Sund, H. (1975). *Eur. J. Biochem.* **52**, 211–220.
Jullien, M. & Arrio, B. (1975). *Biochimie*, **57**, 429–436.
Koppel, D. E. (1972). *J. Chem. Phys.* **57**, 4814–4820.
Landon, M., Melamed, M. D. & Smith, E. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 2369–2373.
Malencik, D. A. & Anderson, S. R. (1972). *Biochemistry*, **11**, 3022–3027.
Markau, K., Schneider, J. & Sund, H. (1971). *Eur. J. Biochem.* **24**, 393–400.
Olson, J. A. & Anfinsen, C. B. (1952). *J. Biol. Chem.* **197**, 67–72.
Pecora, R. (1968). *J. Chem. Phys.* **48**, 4126–4128.
Perrin, J. (1936). *J. de Phys.* **7**, 1–11.
Pilz, I. & Sund, H. (1971). *Eur. J. Biochem.* **20**, 561–568.
Pusey, P. N. (1974). In *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*, pp. 387–428, Plenum Press, New York.
Pusey, P. N., Koppel, D., Schaefer, D. W., Camerino-Otero, R. D., Koenig, S. H. (1974). *Biochemistry*, **13**, 952–960.
Raj, T. & Flygare, W. H. (1974). *Biochemistry*, **13**, 3336–3340.
Reisler, E. & Eisenberg, H. (1970). *Biopolymers*, **9**, 877–889.
Reisler, E. & Eisenberg, H. (1971). *Biochemistry*, **10**, 2659–2663.
Reisler, E., Pouyet, J. & Eisenberg, H. (1970). *Biochemistry*, **9**, 3095–3102.
Ribotta, R., Salin, D. & Durand, G. (1974). *Phys. Rev. Letters*, **32**, 6–9.
Schmitz, K. S. & Pecora, R. (1975). *Biopolymers*, **14**, 521–542.
Sund, H., Pilz, I. & Herbst, M. (1969). *Eur. J. Biochem.* **7**, 517–525.
Sund, H., Markau, K., Minssen, M. & Schneider, J. (1972). In *Structure and Function of Oxidation–Reduction Enzymes* (Akeson, A. & Ehrenberg, A., eds), pp. 681–690, Pergamon Press, New York.
Sund, H., Markau K. & Koberstein, R. (1975). In *Subunits in Biological Systems* (Timasheff, S. N. & Fasman, G. D., eds), part B, Marcel Dekker, New York, in the press.
Tanford, C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*, pp. 317–456, Wiley, New York.
Thusius, D. (1975*a*). *J. Mol. Biol.* **94**, 367–383.
Thusius, D. (1975*b*). In *Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry* (Wyn-Jones, E., ed), pp. 433–436, Reidel, Boston.
Thusius, D. (1976). In *Chemical Relaxation in Molecular Biology* (Rigler, R. & Pecht, I., eds), Springer, Berlin–Heidelberg–New York, in the press.
Thusius, D., Dessen, P. & Jallon, J. M. (1975). *J. Mol. Biol.* **92**, 413–432.

III - Conclusion

La diffusion quasi élastique de la lumière appliquée à l'étude de la polymérisation de la glutamate déshydrogénase donne des résultats en accord avec un modèle de polymérisation linéaire ouverte, avec constante d'équilibre unique. La valeur de la constante déterminée est voisine de celles déduites des résultats obtenus par d'autres techniques (diffusion de la lumière, ultracentrifugation, relaxation thermique).

L'étude de solutions de fortes concentrations (jusqu'à 15 mg/ml) a permis d'observer l'influence de la non idéalité sur le coefficient de diffusion de translation apparent ; ce coefficient est moins sensible à la non idéalité que la masse moléculaire moyenne M_W et le coefficient de sédimentation S_W. Ceci permet de penser que la valeur de la constante d'équilibre déterminée par cette nouvelle technique présente moins d'ambiguité que celles obtenues par des mesures d'intensité diffusée ou d'ultracentrifugation.

IV - Références bibliographiques pour le chapitre IV *

CHUN, P.W. et KIM, S.J. (1969) - Biochemistry 8, 1633-1643.

DESSEN, P (1973) - Biochimie, 55, 405-411.

DESSEN, P. et PANTALONI, D. (1969) - Eur. J. Biochem. 8, 292-302.

EISENBERG, H. (1971) - Account Chem. Res. 4, 379-385.

EISENBERG, H. et TOMKINS, G.M. (1968) - J. Mol. Biol. 31, 37-49.

FRIEDEN, C. (1959) - J. Biol. Chem. 234, 809-814.

JOSEPHS, R. (1971) - J. Mol. Biol. 55, 147-153.

MALENCIK, D.A. et ANDERSON, S.R. (1972) - Biochem. 11, 3022-3027.

SUND, H. PILZ, I. et HERBST, M. (1969) - Eur. J. Biochem. 7, 517-525.

THUSIUS, D. DESSEN, P. et JALLON, J.M. (1975) - J. Mol. Biol. 92, 413-432.

* Ces références ne concernent que les compléments à l'article.

CHAPITRE V

APPLICATION DE LA D.Q.E.L. A L'ETUDE D'UNE PREPARATION MEMBRANAIRE : VESICULES DE RETICULUM SARCOPLASMIQUE DE MUSCLE DE LAPIN.

I - Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de la taille de vésicules membranaires obtenues à partir du Réticulum Sarcosplasmique de muscle strié de lapin. Il est maintenant établi que les ion Ca^{2+} contrôlent la contraction musculaire et que le Réticulum Sarcosplasmique y joue un rôle important de régulation (Tonomura, 1973).

Les vésicules sont formées lors du broyage du muscle, sous l'effet d'un phénomène de tension superficielle, et leur taille est fonction du temps de broyage. Elles conservent la propriété de transporter le Ca^{2+} et ce transport est couplé à l'hydrolyse de l'A.T.P.* qui fournit l'énergie nécessaire au transport. La membrane de ces vésicules a une épaisseur d'environ 70 Å, elle est constituée de lipides et de protéines (80% de ces protéines correspondent à une chaine polypeptidique de masse moléculaire 100 000, une A.T.P. ase) et la localisation de ces protéines dans la membrane serait asymétrique (MacLennan, Holland, 1975).

Dans le cas de particules de grosse taille, comme c'est le cas ici (diamètres supérieurs à 200 Å), la microscopie électronique permet d'avoir une évaluation des dimensions, mais il est bien connu que cette technique nécessite un traitement chimique desséchant qui peut détériorer l'échantillon. Le but de ce travail a donc été de mesurer par D.Q.E.L. les tailles des vésicules purifiées par gradient de sucrose. On a ensuite fait subir à ces vésicules deux sortes de traitements : un traitement par la trypsine et un traitement par la phospholipase C ; le premier de ces enzymes catalyse des réactions d'hydrolyse au niveau des protéines alors que le deuxième agit au niveau des phospholipides. On a alors cherché à déterminer si la structure vésiculaire était conservée et s'il y avait une modification de taille. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux donnés par la microscopie électronique.

* A.T.P. : adénosine 5' triphosphate.

II - Article : J. Membrane Biol. 18, 95-112 (1974).

Description by Quasi Elastic Laser Light Scattering of a Biological Preparation: Sarcoplasmic Reticulum Vesicles

B. Arrio, J. Chevallier, M. Jullien, J. Yon, and R. Calvayrac

Institut de Biochimie, Equipe de Recherche No. 118
and Laboratoire d'Enzymologie Physico-Chimique et Moléculaire,
Groupe de Recherche C.N.R.S. No. 13, Université de Paris Sud 91405 Orsay, France
and Laboratoire de Cytophysiologie de la Photosynthèse
du C.N.R.S, 91190 Gif sur Yvette, France

Received 26 November 1973; revised 7 March 1974

Summary. Quasi elastic laser light scattering (QELS) was used to describe the size and the homogeneity of a membrane preparation: vesicles from skeletal sarcoplasmic reticulum. The data were compared with results obtained by electron-microscopy. The advantages of each method are discussed. By electron-microscopy the average value for the diameter of the vesicles obtained after negative staining is 0.100 ± 0.040 µm. With the freeze-etching technique this value ranges from 0.13 to 0.25 µm. For the same biological preparation the analysis of the QELS recording curves displaying one correlation time (τ) gives an apparent diameter for the vesicles of 0.17 µm. Although it is difficult to describe by QELS the homogeneity of the preparation, the technique remains a very convenient method for evaluating variation of the size of the vesicles, and thus offers the possibility to follow general modification in the size of a vesicular preparation. The effect of trypsin and phospholipase C treatment on vesicle size is studied: an increase of vesicle size is clearly observed after trypsin treatment.

A direct evaluation of the homogeneity and the size of constituents of a membrane preparation after extraction and purification is a major problem. Presently, the only way to solve this problem is by electron-microscopy. However, recent developments in the field of quasi elastic light scattering techniques give a possibility, immediately after preparation, to describe the homogeneity and to study possible structural changes in the membrane structure.

Quasi elastic laser light scattering (QELS) [1, 28] has been already used to determine in aqueous medium, the size of large molecular organizations: for instance, viruses [6, 24, 25], muscular proteins [11], and so on. The purpose of the present paper is to study the possibilities offered by quasi

elastic laser light scattering to describe the state and to evaluate the size of a biological system: vesicles from sarcoplasmic reticulum (SR) of rabbit skeletal muscle. The function of the SR (the releasing and the accumulation of calcium ions during the muscular contraction-relaxation process) was studied by *in vitro* experiments on microsomal fractions isolated from SR by differential centrifugation of the homogenized muscle (for a general presentation of that problem *see* Martonosi [18]). A lot of ultrastructural studies of that material were done by electron-microscopy [3, 12, 17, 29]. So it seems possible to apply QELS to the study of the state of that well-described membrane system. Each experiment is performed on a microsomal preparation displaying a high calcium uptake ability. On the same sample we compare the results obtained by QELS with electron-microscopy pictures. The advantages and the limitations of the QELS technique are discussed.

Materials and Methods

Isolation of Sarcoplasmic Reticulum

The isolation of SR is performed by a procedure somewhat modified from Meissner and Fleischer [22]. Ground muscles are homogenized in 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 0.3 M sucrose, pH 7.5, for 30 sec in a Waring Blendor. The homogenate is centrifuged in a GSA rotor Sorvall 30 min at $8{,}000 \times g$. The supernatant is centrifuged again for 75 min at $95{,}000 \times g$ in a Spinco 30 rotor. The pellet is treated overnight by 0.6 M KCl in the cold room, then washed three times in 10 mM HEPES, pH 7.5, 0.3 M sucrose, 0.6 M KCl and finally resuspended in 5 mM HEPES, 0.3 M sucrose, pH 7.5. At that step the reticulum preparation can be stored for at least a month at −70 °C (fraction A).

A more highly purified preparation can be obtained after a step gradient centrifugation in 5 mM HEPES buffer, pH 7.5, and different concentrations of sucrose in each layer: from 37.1 % (w/w) to 26.7 % (w/w). Forty to fifty mg of fraction A is applied on the top of each tube and centrifuged during 170 min at $106{,}000 \times g$ in a Spinco SW 25.2 rotor at 5 °C. The fractions recovered [F_1 on the top, F_2 between 26.7 and 29.1 % (density g/ml = 1.11 and 1.13), F_3 between 29.1 and 33.9 % layer (density g/ml = 1.13 to 1.16) and a pellet] are diluted in 5 mM HEPES, pH 7.5, centrifuged down and resuspended in the same buffer. These fractions are kept no more than three days in ice before use. All experiments are carried out on fraction F_2.

Calcium Uptake Activity

Calcium uptake activity of SR preparation (30 to 10 µg per ml) is measured in 10 mM HEPES, pH 7.2, with 5 mM ATP, oxalate, $MgCl_2$ medium in 0.1 mM $^{45}CaCl_2$ 0.15 M KCl. The reaction is performed at 20 °C during 10 min and stopped by pressing 1 ml of the reacting solution through a Millipore filter (GS 0.22 µm) following the Martonosi technique [20].

The procedure of Lowry *et al.* [15] is used with bovine serum albumin as a standard to determine the protein concentration. Contamination by mitochondria is monitored

using cytochrome C oxidase activity of the preparation [26]. Phospholipase C (*C. Welchii* B grade from Sigma with no detectable proteolytic activity) and trypsin (Novo) treatments are performed as described in the literature [14, 17, 19].

Electron-Microscopy

SR microsomal preparation in 5 mM HEPES (pH 7.5) buffer are negatively stained by the Horne technique [13]. 200-mesh grids are coated with a Formvar film. The preparation is applied for 2 min on the grid and then dried on filter paper. Negative staining is carried out in a solution of 1% phosphotungstic acid (PTA), brought to pH 7.2 with potassium hydroxide, during 40 to 50 sec, then dried out again. Electron-micrographs are taken with a Hitachi H.S. 8 at 50,000 magnification. The distribution of sarcoplasmic reticulum vesicle diameters is analyzed by classical statistical methods. Polystyrene spheres of nominal diameter 0.109, 0.176, 0.234, and 0.312 μm (from Dow-Latex Feinbiochemica, Heidelberg) are used to calibrate the electron-microscope and the QELS apparatus. These spheres are the references for the evaluation of the average size of the vesicles in each experiment.

SR suspension (F_2 fraction) is centrifuged for 1 hr (130,000 × *g*) in 5 mM HEPES, pH 7.5, 30% glycerol. The specimens are fractured in a Bendix-Blazers apparatus and shadowed at 30°. The pictures are given with 115,000 magnification.

Quasi Elastic Light-Scattering Apparatus

The apparatus used in the present work is almost the same as that already described by Dubin [6]. The 6,328 Å radiation of a Spectra Physics model 124 laser is focused on the scattering cell. The light scattered at an angle θ is focused on a 56 TUVP Radiotechnique photomultiplier, the output of which is amplified by an ATNE (0 to 10 MHz) amplifier and the signal analyzed with a Hewlett-Packard correlator. The autocorrelation function displayed on the oscilloscope is recorded on a Hewlett-Packard X-Y recorder. Diffusion coefficients are obtained by fitting the best exponential curve by the use of a Wang Electronic calculator, model 370–362 E. All the data are taken between 18 and 19 °C, with a protein concentration of 1 mg/ml (unless notified) in a 5 mM HEPES buffer, pH 7.5. The temperature in the cell is constant during the experiment (5 min maximum).

Theoretical

The underlying theory has been extensively presented by Dubin [5, 9] and by Clark *et al.* [2]. Whereas classical light scattering can provide information on the molecular weight of macromolecules in solution on the basis of the intensity of scattered light, quasi elastic light scattering considers the fluctuations of light. The intensity of the light scattered by a suspension of particles or by a solution of macromolecules at time *t* is determined by the superposition of the phases of the scattered waves. Since the phase of the light scattered by each particle is randomly changing as the particle undergoes a random motion, the intensity of the scattered light fluctuates. The scattered intensity at time *t* must reflect a concentration fluctuation

Δc, obeying the translational diffusion equation:

$$\frac{\partial(\Delta c)}{\partial t} = D_T \nabla^2(\Delta c) \tag{1}$$

where D_T is the translational diffusion coefficient and is characterized by a wave vector:

$$|\vec{K}| = |\vec{k}_o - \vec{k}_s| = \frac{4\pi}{\lambda/n} \sin\theta/2 \tag{2}$$

$\vec{k}_o$ and $\vec{k}_s$ being, respectively, the wave vectors of the incident and scattered light. λ is the wavelength of the incident light in vacuum, n the refractive index.

Solving Eq. (1) for a fluctuation having wave vector $\vec{K}$ at time 0, the time dependence of the fluctuation is given by

$$\Delta C_{(t)} = \Delta C_{(t=0)} e^{-K^2 D_T t}. \tag{3}$$

Experimentally, it is possible to define the time dependence of a fluctuation by an average of the fluctuations, at time t and $t+\tau$, where τ is a delay time. The correlation function of the random fluctuations is given by

$$\langle \Delta C_{(t)} \Delta C_{(t+\tau)} \rangle_K = \langle \Delta C^2_{(t)} \rangle e^{-K^2 D_T \tau}. \tag{4}$$

Eq. (4) has been verified in the simplest case of rigid isotropic, monodisperse spherical particles. The influence of particle length, rotational diffusion and polydispersity have been already discussed [4, 8, 23, 27]. The diffusion coefficient is obtained by the measurement of the time constant of the photocurrent correlation function [7, 10, 27]. The time constant τ_c is defined by

$$\frac{1}{\tau_c} = 2K^2 D_T \tag{5}$$

for homodyne detection; this is the case for our spectrometer. The particle radii are derived from the Stokes relation:

$$D_T = \frac{kT}{6\pi\eta r} \tag{6}$$

where η is the viscosity of the solvent, T the temperature in degrees K, k the Boltzman constant, and r the radius.

Results

The data showing the purification of fraction A by step sucrose gradient centrifugation appear in Table 1. All experiments are done on fraction F_2 which displays the highest calcium uptake ability and a very low cytochrome C oxidase activity.

Table 1. Activities of the different fractions obtained after step sucrose gradient centrifugation

Fraction	Density (g/ml, 5 °C)	Ca^{++} Uptake [a]	Cyto C oxidase activity [b]
A	–	1.5 – 2.6	0.052
F_1	top of the gradient	0.01 – 0.05	0.002
F_2	1.11 – 1.13	3.9 – 5.7	0.004
F_3	1.15 – 1.16	0.7 – 1.5	0.104

[a] μmoles Ca^{++} accumulated/mg protein at 20 °C, pH 7.3, after 10 min according to the Martonosi technique [20].
[b] μmoles cyto C oxidized/min/mg protein at 20 °C, pH 7.5 [26].

F_2 Fraction

Electron-micrographs of fragmented sarcoplasmic vesicles are shown in Figs. 1, 2 and 3. Fraction A (Fig. 1*A*) is composed of vesicles and tadpole-like structures, as already described in the literature [3, 12, 17, 29]. These tubular structures are eliminated after sucrose gradient centrifugation in the fraction F_2 (Fig. 2). A population of apparently spherical vesicles, the diameter of which ranges from 0.04 to 0.120 μm, is seen. The distribution of the vesicles as a function of their diameters (Fig. 4*A*) can be described as follows: average value $(\bar{x}) = 0.100$ μm and standard deviation $(\sigma) = 0.040$ μm.

The sizes of the vesicles can be evaluated by freeze etching (Fig. 3). They fall in the range from 0.13 to 0.25 μm: this is in agreement with the average size given by Deamer and Baskin [3] but different with the results obtained from the negative staining method.

This description of the fraction F_2 by electron-microscopic techniques, displaying a good homogeneity in size and shape, is very convenient to test the results obtained by the QELS technique. Electron-micrographs of latex spheres used as control samples for both the electron-microscope and the QELS apparatus are shown in Fig. 1 (*B–C*).

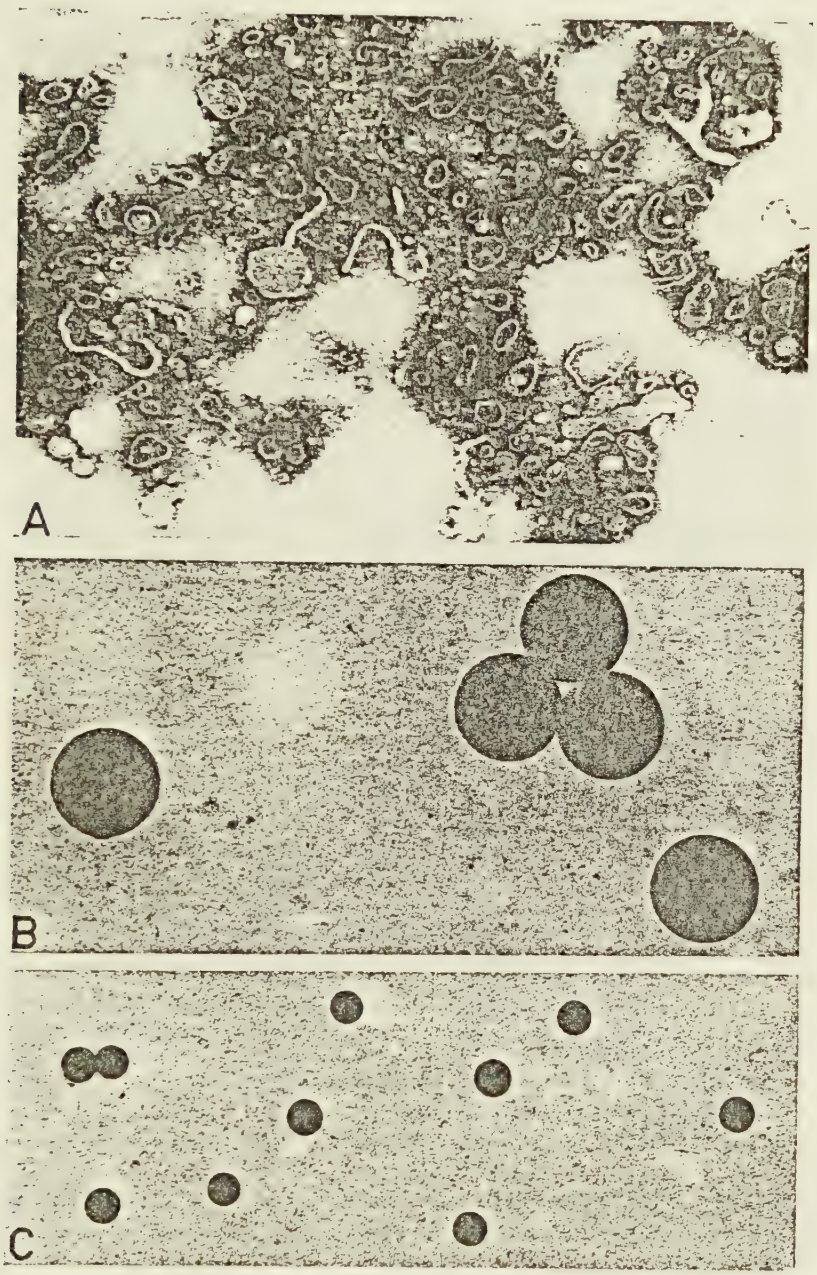


Fig. 1. Electron-micrographs of sarcoplasmic reticulum vesicles and latex spheres. (*A*) Crude sarcoplasmic reticulum vesicle preparation (fraction A) Ca^{++} uptake activity: 1.5 to 2.6 μmoles Ca^{++}/mg protein under standard conditions (*see text*). Negatively stained preparation with 1% potassium phosphotungstate, pH 7.2. Magnification ×50,000. Latex spheres of nominal diameter 0.312 μm (*B*) and 0.109 μm (*C*) suspended in aqueous medium. Magnification ×50,000. These spheres were used to calibrate the QELS apparatus

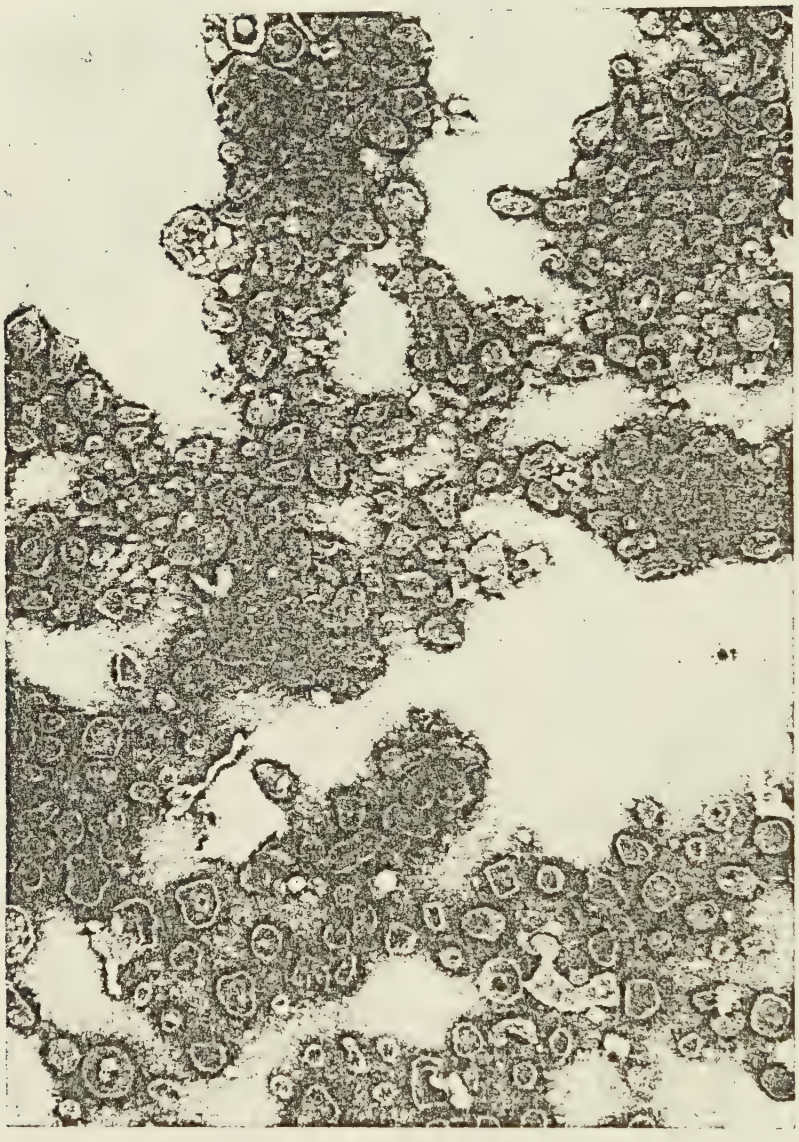


Fig. 2. Electron-micrograph of negatively stained purified sarcoplasmic reticulum preparation (fraction F_2). Calcium uptake activity: 3.9 to 5.7 µmoles Ca^{++}/mg protein under standard conditions (*see text*). Negatively stained as already described. Magnification × 50,000

The correlation time 590 ± 10 µsec for the fraction F_2 in 5 mM HEPES buffer, pH 7.5, obtained from Fig. 5, is not concentration dependent from 0.7 to 7.0 mg/ml (Fig. 6). This indicates the absence of aggregates in this range of concentration. So we evaluate the apparent diameter of the F_2

Fig. 3. Freeze-etch image of purified sarcoplasmic reticulum preparation (fraction F_2). The sarcoplasmic reticulum suspension is freeze-etched (*see text*). Magnification × 115,000

vesicular fraction as 0.170 μm. We have observed that the decay constant of the autocorrelation function [Eq. (5)] obeys the angular relation (3) between 33° and 135° (Fig. 7); this is in agreement with the absence of filaments or tadpole-like structures. The angular distribution of the intensity of the scattered light indicates that the vesicles exhibit a spherical shape.

F_2 after Trypsin and Phospholipase C Treatment

The same studies were performed with fraction F_2 previously treated with trypsin or with phospholipase C. In both cases the calcium uptake ability of sarcoplasmic reticulum vesicles is destroyed. Under the same

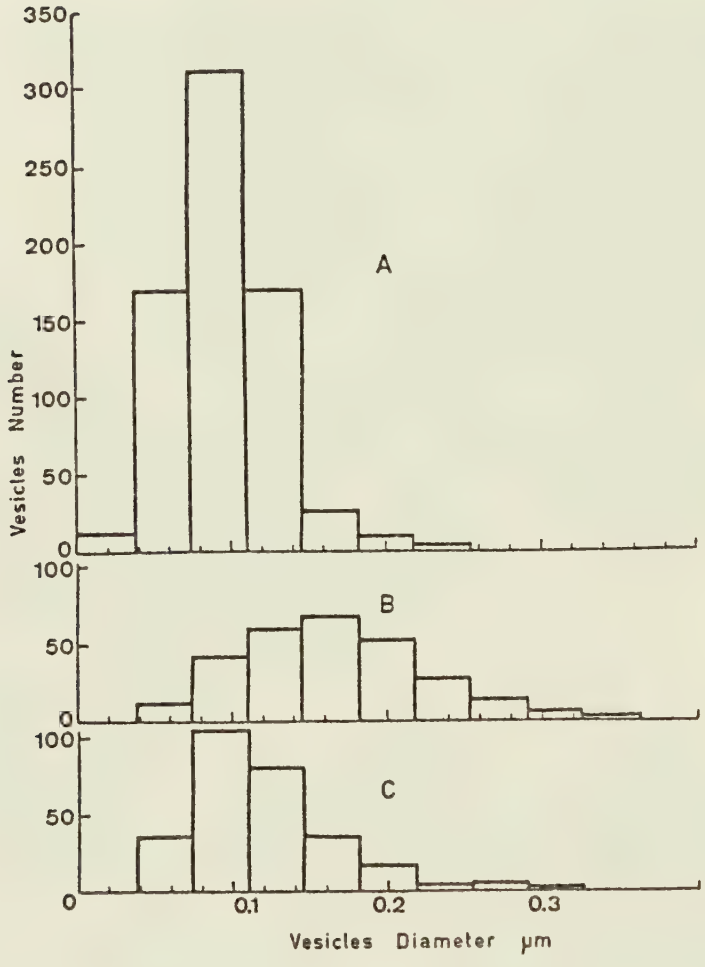


Fig. 4. Diameter distribution of sarcoplasmic reticulum preparations. (*A*) Fraction F_2 — The distribution is measured from the electron-micrograph presented in Fig. 2. The measured distribution has not been corrected since large vesicles (diameter higher than twice the average diameter) represented less than 1% of the total vesicle number. (*B*) Diameter distribution of highly purified sarcoplasmic preparation treated by trypsin. The distribution is measured from the preparation presented in Fig. 8*A*. (*C*) Diameter distribution of highly purified sarcoplasmic reticulum treated by phospholipase C. The distribution is measured from the preparation presented in Fig. 8*B*

experimental conditions, control preparations without enzyme treatment are able to actively accumulate calcium. As we can see by electron-microscopy (Fig. 8*A* and *B*), the different fractions are always vesicular, but the average size of the elements increases: notably in the case of the trypsin treatment where $\bar{x} = 0.18$ μm, and little for the phospholipase C-treated preparation

Fig. 5. Direct recording of the correlation function obtained for the fraction F_2. Fraction F_2: 1 mg/ml in HEPES buffer, pH 7.5, at 18 °C. The light is scattered at $\theta = 90°$

Table 2. Comparative results obtained by QELS and by electron-microscopy with the sarcoplasmic reticulum vesicles (F_2 fraction)

Sample	Electron-microscopy	QELS	
	Diameter, average value (µm) ($\bar{x}$)	Diffusion coefficient $\times 10^8$ cm^2 sec^{-1}	Diameter (µm)
Latex	0.120 0.109[a] 0.310 0.310[a]	3.87 ± 0.11 1.43 ± 0.07	0.110 ± 0.003 0.298 ± 0.008
F_2	0.100 ± 0.040	2.41 ± 0.04	0.175 ± 0.003
F_2 (trypsin-treated)	0.170 ± 0.060	1.64 ± 0.02	0.258 ± 0.003
F_2 (Phospholipase C-treated)	0.130 ± 0.055	1.86 ± 0.02	0.227 ± 0.003

[a] Nominal diameter given by Dow Chemical, cm^2 sec^{-1}.

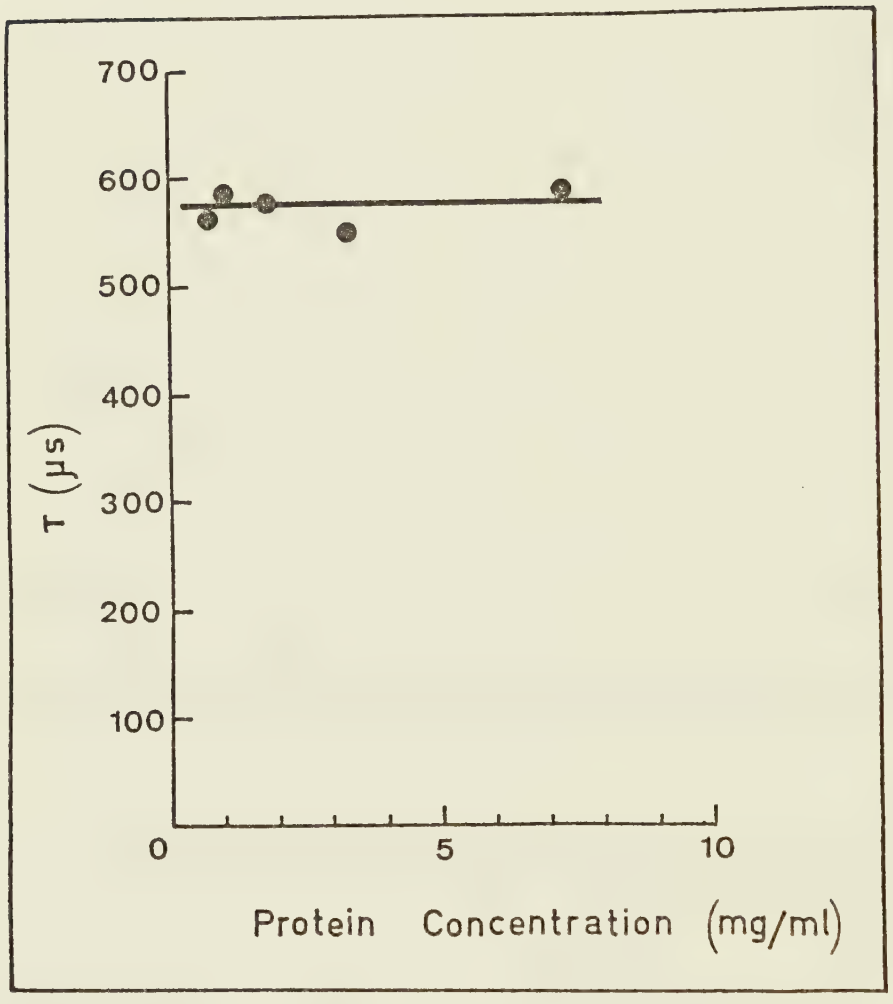


Fig. 6. Dependence of the correlation time on the concentration of sarcoplasmic preparations (F_2 fraction). The experiments are done as described in the text, in 5 mM HEPES, pH 7.5. $\theta = 90°$

where $\bar{x} = 0.12$ μm with a more pronounced heterogeneity (Fig. 4*B* and *C*). The statistical parameters describing these preparations are presented in Table 2.

The correlation times obtained with the QELS technique are 870 ± 10 μsec and 760 ± 10 μsec, respectively, for trypsin and phospholipase C-treated preparations. The apparent diameters of the vesicles obtained would be, respectively, 0.25 and 0.22 μm; so we can detect by this technique

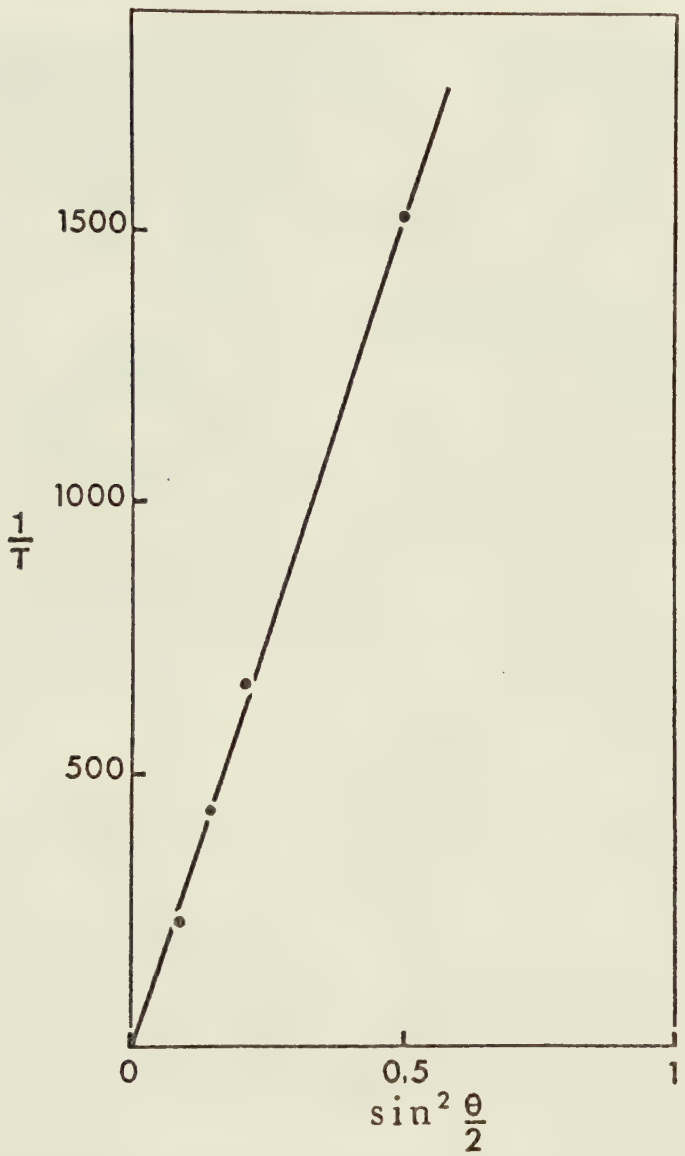


Fig. 7. Dependence of the opposite of the correlation time on the angle of the light scattered for the fraction F_2. Fraction F_2: 1 mg/ml in HEPES buffer, pH 7.5, at 18 °C. $35° < \theta < 90°$

a large increase of the vesicle size in the preparation, although, by electron-microscopy, this phenomenon is observed clearly only for the trypsin-treated SR.

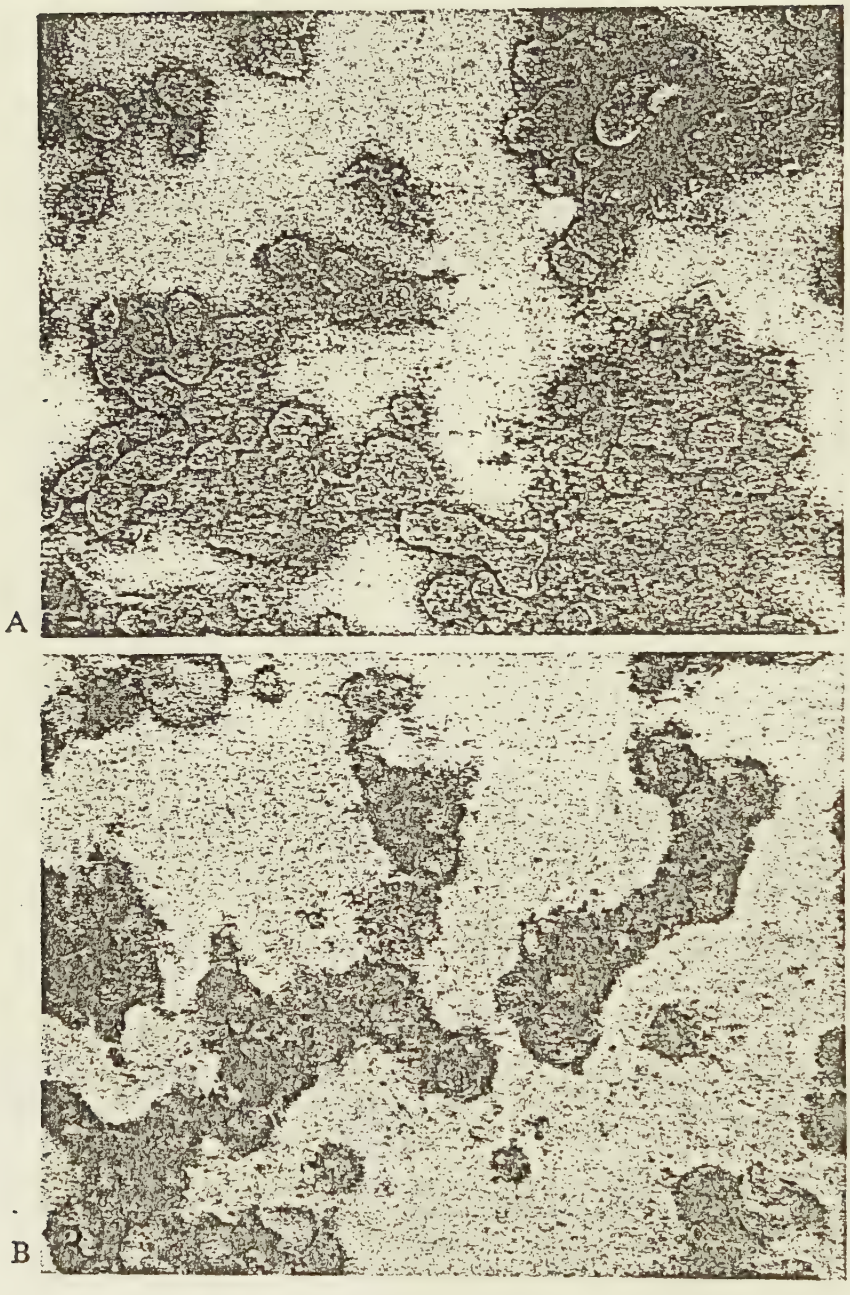


Fig. 8. Negatively stained sarcoplasmic reticulum vesicles after enzymatic treatments. (*A*) Effect of trypsin on F_2 fraction (4.15 mg/ml) was treated by trypsin (0.2 mg/ml), pH = 7.0, 22 °C during 20 min. The reaction was quenched by soybean trypsin inhibitor. (*B*) Effect of phospholipase C. F_2 fraction (6.8 mg/ml) was treated by phospholipase C (1.5 mg/ml), pH 7.3, 25 °C during 2 hr, then washed three times by 1% bovine serum albumin solution

Discussion

Description of the Fraction F_2 by Electron-Microscopy

The purification of fragmented sarcoplasmic reticulum by extensive 0.6 M KCl treatment and step sucrose gradient centrifugation gives a fraction F_2 displaying good calcium uptake activity under standard conditions. In a recent paper, Meissner *et al.* [21] described a more sophisticated method to purify sarcoplasmic reticulum vesicles. The calcium uptake activity of their preparations was the same as that which we obtain for the F_2 fraction. The absence of tadpoles in negative staining electron-micrographs and in freeze-etching pictures shows clearly that this kind of structure has nothing to do with the calcium transport activity of the biological material. The vesicle size for that fraction lay around 0.100 ± 0.040 μm. This result is in agreement with those of Yu *et al.* (0.1 to 0.16 μm) [29], Deamer and Baskin (0.12 ± 0.03 μm) [3] and Heuson-Stiennon *et al.* (0.120 μm) [12]. As we can see on Figs. 2 and 4, the preparation is very homogenous in size. The size obtained (0.13 to 0.25 μm) by freeze etching is greater than the average diameter measured by the negative staining technique, but the former is not accurate enough for the evaluation of the homogeneity since the number of vesicles observed is lower.

The average size obtained for the fraction F_2 is influenced by the intensity and the duration of the homogenization as well as by the selection which occurs during subsequent differential centrifugation. However, we have to point out two facts; first, the procedure we use to purify sarcoplasmic reticulum seems to be the most efficient one to obtain the highest specific calcium transport activity, mostly because mitochondrial fragments are easily eliminated; second, it appears that a modification in the vesicle size is more or less correlated with a destruction of the biological activity (*see below*). In view of these two remarks we can define artificially an "active vesicular size" which corresponds, for the purification procedure used, to the best specific activity.

Modification of Vesicle Size after Trypsin or Phospholipase C Treatment

After phospholipase C and trypsin treatment the vesicles are not destroyed. However, a variation in their size is observed. In both cases we notice an increase in the average diameter (Fig. 4 and Table 2), more pronounced for the trypsin-treated preparation than for phospholipase C, even though the action of these enzymes is completely different. As Martonosi *et al.* stated [18], an incomplete but specific hydrolysis of phosphati-

dylcholine of the membranes inhibited calcium transport activity without a comparable effect on the formation of phosphoprotein intermediate. The vesicles were not destroyed [13]. Since our experimental conditions for the hydrolysis by phospholipase C (*C. welchii* free of proteolytic activity) are identical to those described by Martonosi *et al.* [18, 19], we can assume that the slight modification in size observed is due to partial removal of phosphatidylcholine.

Since we work in absence of sucrose in the buffer used for trypsin digestion, the removal of both surface spheres and stalks occurs as presented by Ikemoto *et al.* [14] and Martonosi [17]. The treatment induces a partial removal of proteins. Again an increase in vesicle size is observed by the two different techniques. Therefore, qualitatively different treatments of the membrane seem to induce the same effect on the vesicle size.

This size increase seems to be a very general phenomenon. In our case, with aging vesicles which display at least 10% of the original calcium uptake ability or with sarcoplasmic reticulum preparations treated by some drugs (J. Chevallier, *unpublished results*), we observed an increase of the average size of the vesicles by QELS. The same phenomenon occurred with reconstituted membrane preparations. For instance, Mac Lennan *et al.* [16] obtained vesicle formation by reconstituted vesicles displaying activated ATPase activity, with a diameter of about 0.7 to 0.8 μm (from Fig. 2*A* of reference [16]). No clear explanation can be given for this general increase observed in this experiment.

Comparison between Electron-Microscopy and QELS Results

In discussing these results, it is tempting to consider two alternative proposals: the histograms obtained from electron-micrographs are the real image of the vesicle size and QELS cannot accurately describe it, or the opposite. If electron-micrographs reflect exactly the size heterogeneity of the F_2 fraction, it is clear that the best fit of the exponential autocorrelation function given by QELS, leading to a single correlation time, cannot describe the size distribution. At this step it is necessary to discuss this limitation and the difference observed between the diameters measured by both techniques. Assuming that the molecular weight of the vesicles varies as the cube of the radius and combining that with the F_2 fraction size distribution, one can observe that the contribution of the larger diameter vesicles increases the diameter measured by QELS. This leads to an apparent vesicle diameter of 0.17 μm. A direct simulation of the F_2 distribution performed with latex spheres (0.109, 0.176 and 0.234 μm) leads to a correlation time

of 586 μsec, comparable with that found for the F_2 fraction. We can point out also that the contribution of the larger vesicles cannot be extrapolated always using a cubic function of the radius, but it is diminished due to the increasing ratio between the particle diameter and the wavelength, as already shown by Mie [23]. Similar considerations of the histograms show that the differences between electron-micrographs and QELS data can be explained by these effects.

This is clearly supported in the case of the phospholipase C-treated preparation (Figs. 4*C* and 8*B*) where the weight of vesicles of higher diameter gives us by QELS an apparent diameter of 0.22 μm, very different from the average value obtained by EM (0.12 μm).

On the other hand, the freeze-etching data show that the vesicle size is greater than that observed by negative staining technique. Therefore, the negative staining histograms cannot be considered as an absolute description of the size of the constituents of the preparation.

Thus, QELS displays a severe limitation in describing the heterogeneity of a biological preparation, as has already been shown by Dubin [4, 8] on the problem of molecular weight for various viruses and on the lysozyme denaturation. However, we observe that this technique is a very useful and elegant one for following the gross structural behavior of reticulum vesicles by correlating QELS size determination and the modification in activity under various conditions, such as trypsin and phospholipase C treatment.

Conclusion

Generally, when membranes are prepared, the time delay in which activities and structural behavior can be observed is very narrow. As we show in this paper, QELS offers the possibility of a size determination under the same conditions as those of the activity measurements. Another interesting feature is the rapidity of the acquisition of information when correlators are used for the light-scattering fluctuations analysis. QELS is a good complement of electron-microscopy for the description of biological material, but the former can be used as a dynamic tool to evaluate the impact of chemical modifications and drug action on membrane structure.

The authors are greatly indebted to G. Durand and I. Smith from the Laboratoire de Physique des Solides (Orsay) for helpful discussions. They want to acknowledge Dr. G. Nemethy for reviewing the manuscript and Mrs J. Carette and A. Lacourly for skillful technical assistance. This work was supported by D.G.R.S.T. conventions 72.7.0490 and 72.7.0176.

References

1. Candau, S. 1969. Diffusion inélastique de la lumière par des liquides. *Ann. Phys.* 4:21
2. Clark, N. C., Lunacek, J. H., Benedek, G. B. 1970. A study of brownian motion using light scattering. *Amer. J. Phys.* 38:575
3. Deamer, D. W., Baskin, R. J. 1969. Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations. *J. Cell. Biol.* 42:296
4. Dubin, S. B. 1970. Quasi elastic light scattering from macromolecules. Ph. D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass.
5. Dubin, S. B. 1972. Measurement of translational and rotational diffusion coefficients by laser light scattering. *In:* Methods in Enzymology. C. M. W. Hirs and S. N. Timasheff, editors. Vol. 26, Part C, p. 119. Academic Press Inc., New York
6. Dubin, S. B., Benedek, G. B., Bancrift, F. C., Freifelder, D. 1970. Molecular weights of coliphages and coliphage DNA. II. Measurement of diffusion coefficients using optical mixing spectroscopy, and measurement of sedimentation coefficients. *J. Mol. Biol.* 54:547
7. Dubin, S. B., Clark, N. A., Benedek, G. B. 1971. Measurement of rotational diffusion coefficient of lysozyme by depolarized light scattering: Configuration of lysozyme in solution. *J. Chem. Phys.* 54:5158
8. Dubin, S. B., Feher, G., Benedek, G. B. 1973. Study of the chemical denaturation of lysozyme by optical mixing spectroscopy. *Biochemistry* 12:714
9. Dubin, S. B., Lunacek, J. H., Benedek, G. B. 1967. Observation of the spectrum of light scattered by solution of biological macromolecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.; Physics.* 57:1164
10. French, M. J., Angus, J. C., Walton, A. G. 1971. A study of collagen and gelatin solution by optical self beat spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 251:320
11. Fujime, S., Ishiwaka, S. 1971. Dynamic study of F-actin by quasi elastic scattering of laser light. *J. Mol. Biol.* 62:251
12. Heuson-Stiennon, J. A., Wanson, J. C., Drochmans, P. 1972. Isolation and characterization of the sarcoplasmic reticulum skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 55:471
13. Horne, R. W. 1961. Negative staining methods. *In:* Techniques for Electron Microscopy. D. M. Kay, editor. Chap. XI, p. 328. Blackwell Scientific Publications, Oxford
14. Ikemoto, N., Sreter, F. A., Gergely, J. 1971. Structural features of the surface of the vesicles of FSR-Lack of functional role in Ca^{2+} uptake and ATPase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 147:571
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265
16. Mac Lennan, D. H., Seeman, P., Iles, G. H., Yip, C. C. 1971. Membrane formation by the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 246:2702
17. Martonosi, A. 1968. Sarcoplasmic reticulum. V. The structure of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 150:694
18. Martonosi, A. 1972. Biochemical and clinical aspects of sarcoplasmic reticulum function. *In:* Current Topics in Membranes and Transport. F. Bronner and A. Kleinzeller, editors. Vol. 3, p. 83. Academic Press Inc., New York
19. Martonosi, A., Donley, J. R., Pucell, A. G., Halpin, R. A. 1971. Sarcoplasmic reticulum. XI. The mode of involvement of phospholipids in the hydrolysis of ATP by sarcoplasmic reticulum membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 144:529
20. Martonosi, A., Feretos, R. 1964. Sarcoplasmic reticulum. I. The uptake of Ca^{++} by sarcoplasmic reticulum fragments. *J. Biol. Chem.* 239:648
21. Meissner, G., Conner, G. E., Fleischer, S. 1973. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+}-pump and Ca^{2+} binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 298:246

22. Meissner, G., Fleischer, S. 1971. Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **241**:356
23. Mie, G. 1908. Beiträge zur Optik trüber Medien. *Ann. Phys., Lpz.* **25**:377
24. Salmeen, I., Gill, D., Rimai, L. 1972. Application of laser beat frequency spectroscopy to the detection and characterization of an oncogenic RNA virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**:1172
25. Wada, A., Ford, N. C., Karasz, F. E. 1971. Rotational diffusion of tobacco mosaïc virus. *J. Chem. Phys.* **55**:1798
26. Wharton, D. C., Tzagoloff, A. 1967. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *In:* Methods in Enzymology. R. W. Estabrook and M. E. Pullman, editors. Vol. 10, p. 245. Academic Press Inc., New York
27. Wilson, W. W., Johnson, C. S., Jr. 1972. Quasi elastic light scattering from two component mixtures. *J. Phys. Chem.* **76**:2744
28. Yeh, Y., Keeler, R. N. 1969. A new probe for reaction kinetics: The spectrum of scattered light. *Quart. Rev. Biophys.* **2**:1
29. Yu, B. P., De Martinis, F. D., Masoro, E. J. 1968. Relation of lipid structure of sarcotubular vesicles to Ca^{++} transport activity. *J. Lipid. Res.* **9**:492

III - Etude de l'hétérogénéité de la préparation par la méthode des cumulants

Il ressort de cet article que, pour des vésicules membranaires purifiées par gradient de sucrose, les diamètres apparents obtenus par des techniques différentes telles que diffusion quasi élastique de la lumière et microscopie électronique (coloration négative ou cryo-décapage) ne sont pas les mêmes. La conclusion en est que, dans le cas d'un système hétérogène la microscopie électronique permet d'obtenir un histogramme de répartition des diamètres des vésicules, alors que la D.Q.E.L. ne donne qu'un diamètre apparent ; par contre, la D.Q.E.L. permet de travailler dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour les mesures d'activité.

La méthode d'analyse proposée par Koppel (chapitre II, paragraphe III) permet de définir une fonction de distribution $G(\Gamma)$ des constantes de vitesse (ou des coefficients de diffusion de translation) au moyen des cumulants. Une préparation de vésicules de Réticulum Sarcoplasmique semblait donc appropriée pour l'application d'une telle méthode d'analyse, en vue d'une comparaison plus précise entre les résultats obtenus par diffusion quasi élastique et par microscopie électronique.

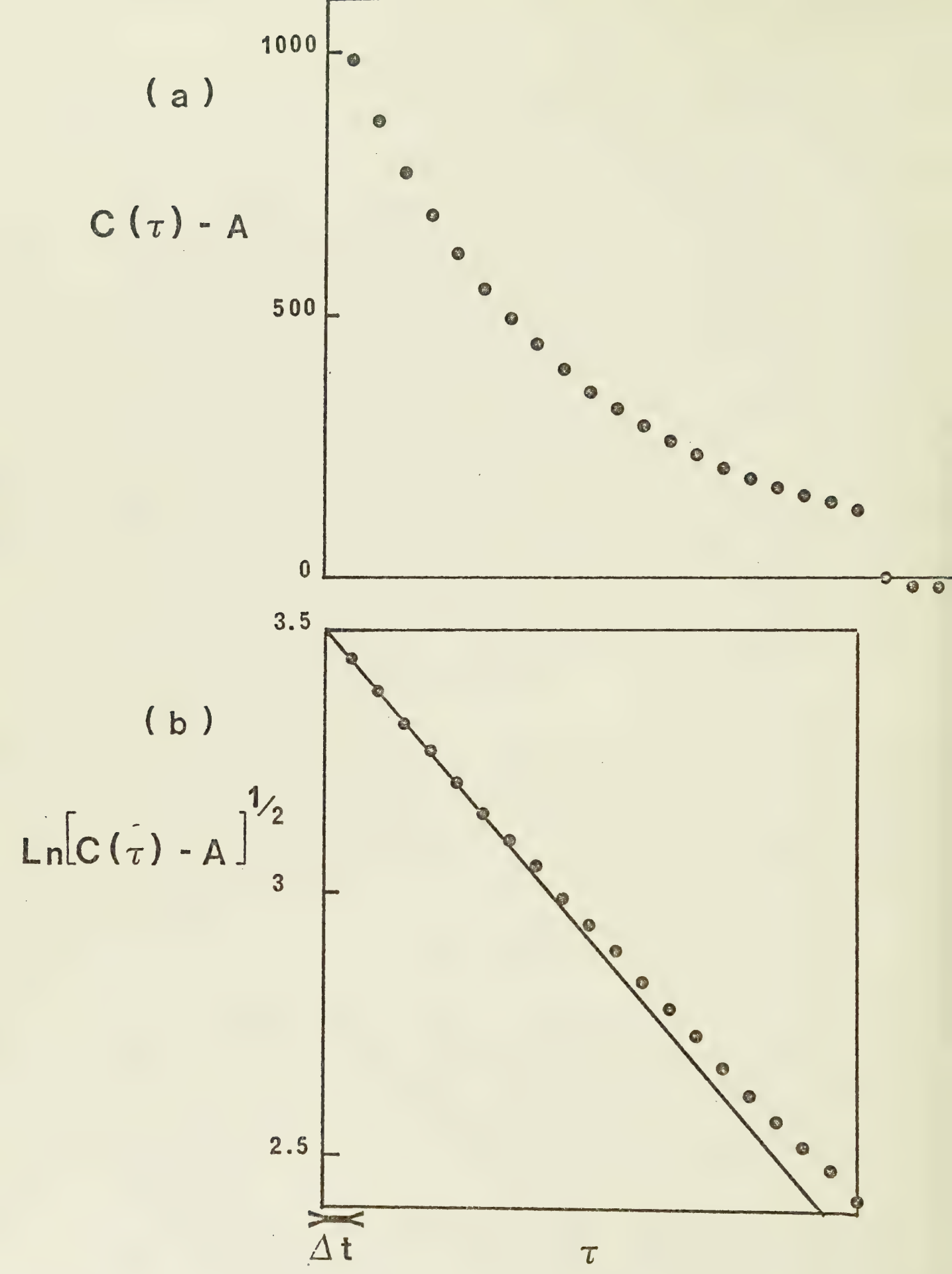
1) Mode opératoire

Une courbe expérimentale $C(\tau)$ obtenue avec le corrélateur modifié et représentée sur la figure 1(a) ; les quatre derniers canaux correspondent à des retards respectifs de 101, 102, 103 et 104 Δt. L'asymptote de la courbe expérimentale est calculée en faisant la moyenne des contenus de ces quatre derniers canaux :

$$A = \frac{X_{101} + X_{102} + X_{103} + X_{104}}{4}$$

La fonction $\text{Log}\left[C(\tau) - A\right]^{1/2}$, où $\tau = \ell\,\Delta t$ avec $1 \leqslant \ell \leqslant 20$, est ensuite analysée sous forme d'un polynome en τ de degré n, n étant fonction du nombre de cumulants souhaités ; le polynome étant linéaire par rapport aux inconnues (qui sont les coefficients de $\tau^m/m!$ avec $1 \leqslant m \leqslant n$), une méthode de régression linéaire, avec pondération, est appliquée (Pusey et al., 1974).

Si l'on veut obtenir une erreur minimale sur l'évaluation des cumulants, ce genre de méthode d'analyse pose deux problèmes importants : l'un au niveau expérimental qui est le choix du retard incrémental Δt, l'autre au niveau de l'analyse qui est le choix du degré n du polynome.



Sarcoplasmic Reticulum : $\Delta t = 60 \mu s$, $\bar{\Gamma}\tau_{max} \simeq 1.2$

Chapitre V - Figure 1 : Fonction d'autocorrélation du photocourant obtenue avec une préparation de vésicules de Réticulum Sarcoplasmique.
Température : 22°C.
$\overline{\Gamma}\ \tau_{max} = 1,2$ ($\tau_{max} = 20\ \Delta t$)

2) Cas d'une suspension de sphères de latex

La méthode a d'abord été testée avec une suspension de billes de polystyrène (Dow Chemical Co.) de diamètre d = 0,109 µ. On a représenté sur la figure 2, en coordonnées semi-logarithmiques, une courbe expérimentale obtenue à partir d'une telle suspension. Toute une série de courbes expérimentales a été enregistrée pour six valeurs différentes de Δt, et pour chacune de ces valeurs trois analyses ont été essayées (avec des polynomes de degré 1,2 et 3). Les résultats sont représentés sur la figure 3.

On constate que :

- la représentation semi-logarithmique d'une courbe expérimentale montre une variation strictement linéaire ;

- le cumulant d'ordre 1, $\overline{\Gamma}$, est constant et ne dépend pas du degré du polynome d'analyse dans un large domaine ($0,8 \leqslant \overline{\Gamma}\, \tau_{max} \leqslant 2$).

Pour ce domaine expérimental, l'ensemble des analyses avec un polynome de degré 2 donne les valeurs :

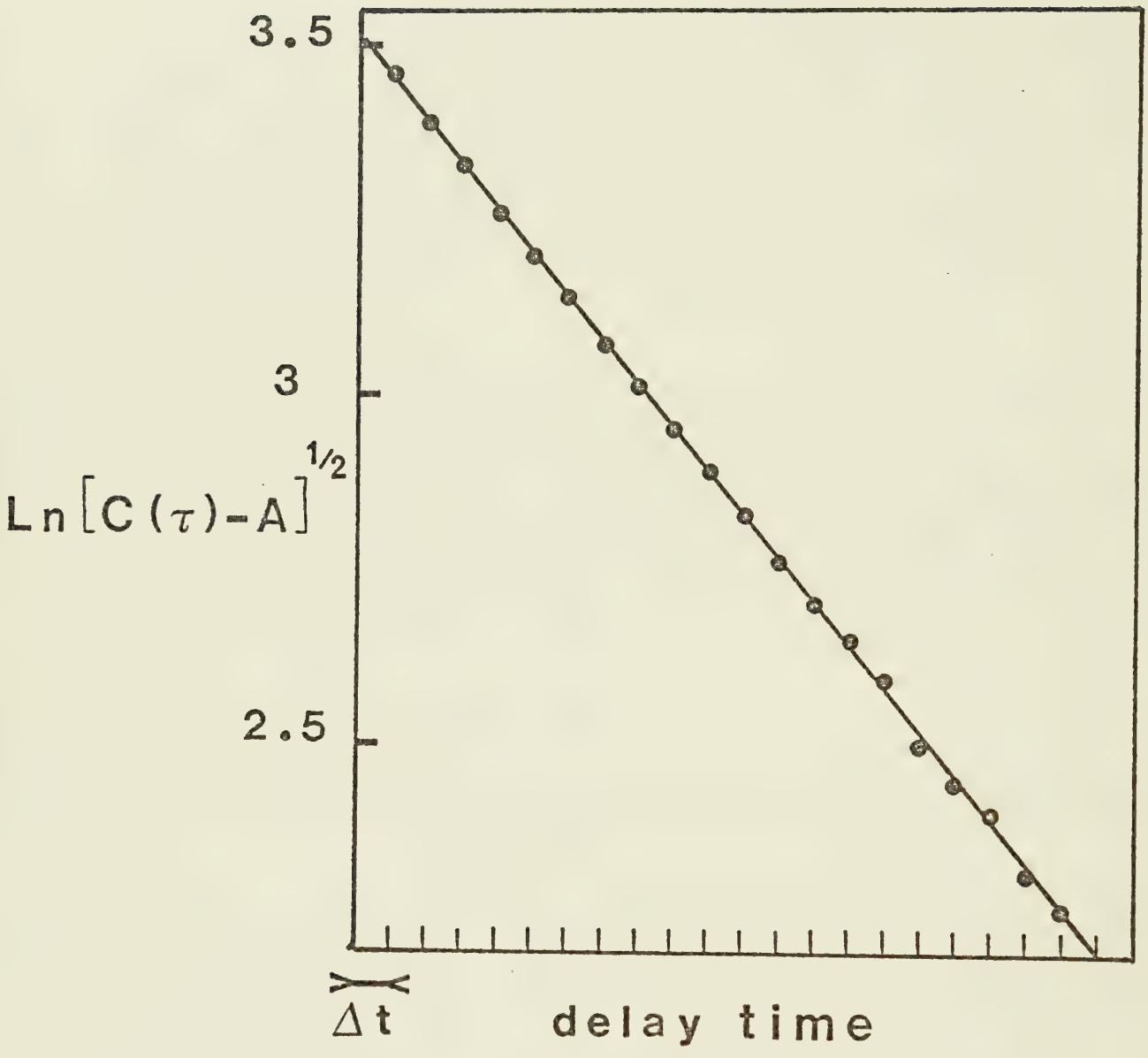
$$\begin{cases} K_1 = \overline{\Gamma} = 1290 \pm 25\ s^{-1} \\ \dfrac{K_2}{\overline{\Gamma}^2} = 0,02 \pm 0,06 \end{cases}$$

Le diamètre moyen correspondant est la moyenne z des diamètres, soit :

$$\overline{d} = \frac{\Sigma < I_i > d_i}{\Sigma < I_i >} = 0,114\ \mu\ ,$$

$< I_i >$ étant l'intensité de lumière diffusée par la sphère de diamètre d_i. Cette valeur est très voisine du diamètre nominal donné par Dow Chemical Company ($d = 0,109 \pm 0,003\ \mu$) et la suspension peut être considérée comme monodisperse puisque le cumulant d'ordre 2 est pratiquement nul.

Une remarque peut être faite à propos des résultats représentés sur la figure 3 : l'erreur statistique sur $\overline{\Gamma}$ augmente avec le degré du polynome d'analyse. On conçoit donc les limites d'une telle méthode d'analyse : la caractérisation de $G(\Gamma)$ nécessite la connaissance du plus grand nombre possible de cumulants, mais, plus ce nombre augmente, plus les erreurs respectives sur chacun des cumulants sont importantes (Brown et Pusey, 1974).



Latex (0.109μ) : $\Delta t = 50\,\mu s$, $\bar{\Gamma}\tau_{max} = 1.3$

Chapitre V - Figure 2 : Fonction d'autocorrélation du photocourant obtenue avec une suspension de sphères de latex (diamètre : 0,109 µ).

Chapitre V - Figure 3 : Méthode des cumulants appliquée au cas d'une suspension de sphères de latex.

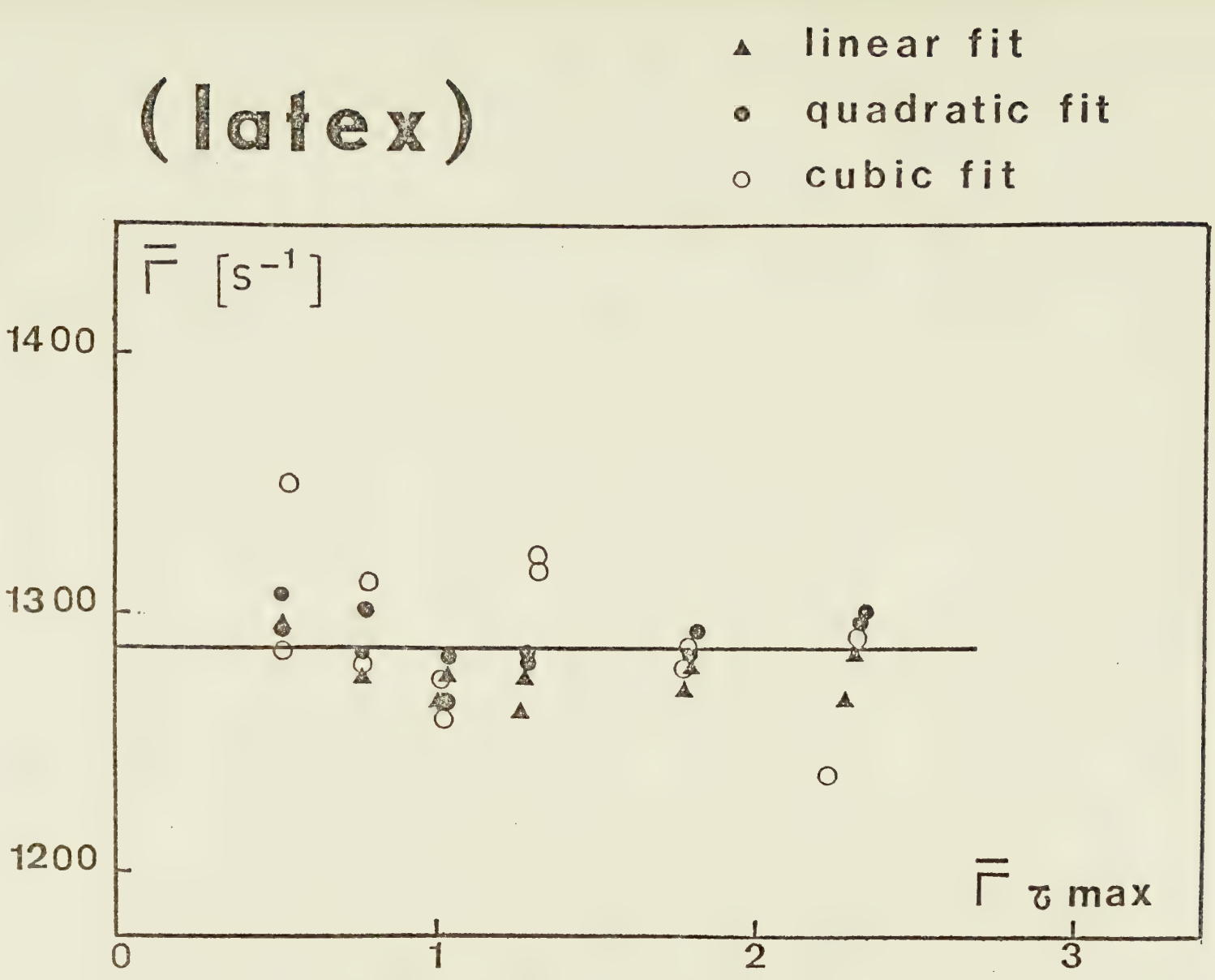
○ : analyse avec un polynome de degré 3,

● : " " " " 2,

▲ : " " " " 1

$\tau_{max} = 20\ \Delta t$.

(latex)


linear fit
quadratic fit
cubic fit
$\bar{\Gamma}$ [s^{-1}]
1400
1300
1200
0
1
2
3
$\bar{\Gamma}$ τ max

3) Cas d'une fraction de Réticulum Sarcoplasmique purifiée

La méthode des cumulants a été ensuite appliquée à l'étude d'une fraction de Réticulum Sarcoplasmique obtenue après purification par gradient de sucrose.

D'après les résultats représentés sur les figure 1(b) et 4, certaines constatations peuvent être faites, à savoir que :

- d'une part, la fonction Log $[C(\tau) - A]^{1/2}$ présente une légère incurvation ;

- d'autre part, l'analyse avec un polynome de degré 1 donne une valeur de $\overline{\Gamma}$ qui est fonction du Δt expérimental, alors que les analyses avec des polynomes de degré 2 ou 3 donnent une valeur de $\overline{\Gamma}$ constante dans le domaine $0,8 < \overline{\Gamma}\ \tau_{max} \leqslant 2,5$.

La solution est donc bien polydisperse, comme le laissait prévoir l'histogramme obtenu à partir des clichés de microscopie électronique. Il s'agit maintenant de caractériser la distribution $G(\Gamma)$.

Les valeurs moyennes des 3 premiers cumulants, calculées à partir des résultats des douze expériences réalisées dans le domaine $\overline{\Gamma}\ \tau_{max} > 0,8$, sont transcrites dans le tableau suivant :

Degré du polynome d'analyse n	Cumulants normalisés		
	$K_1 = \overline{\Gamma}$	$K_2/\overline{\Gamma}^2$	$K_3/\overline{\Gamma}^3$
2	$910 \pm 30\ s^{-1}$	$0,16 \pm 0,04$	
3	$910 \pm 40\ s^{-1}$	$0,16 \pm 0,11$	$0,011 \pm 0,250$

Il résulte de l'examen de ce tableau que l'augmentation du degré du polynome d'analyse entraine bien l'augmentation de l'erreur statistique sur chacun des cumulants et que, dans notre cas, l'analyse des courbes expérimentales avec un polynome d'ordre 2 est suffisante. La distribution $G(\Gamma)$ peut donc être définie par les cumulants.:

$K_1 = \overline{\Gamma} = 910 \pm 30\ s^{-1}$, valeur moyenne,

$K_2/\overline{\Gamma}^2 = 0,16 \pm 0,04$, variance normalisée,

$K_3/\overline{\Gamma}^3 = 0$.

Ceci correspond à une distribution $G(\Gamma)$ symétrique et assez large. Sachant qu'on a la relation :

$$\Gamma = \frac{K^2\ kT}{3\pi\ \eta d} \qquad \text{(cf. article)},$$

Chapitre V - Figure 4 : Méthode des cumulants appliquée au cas d'une suspension de vésicules de Réticulum Sarcoplasmique.

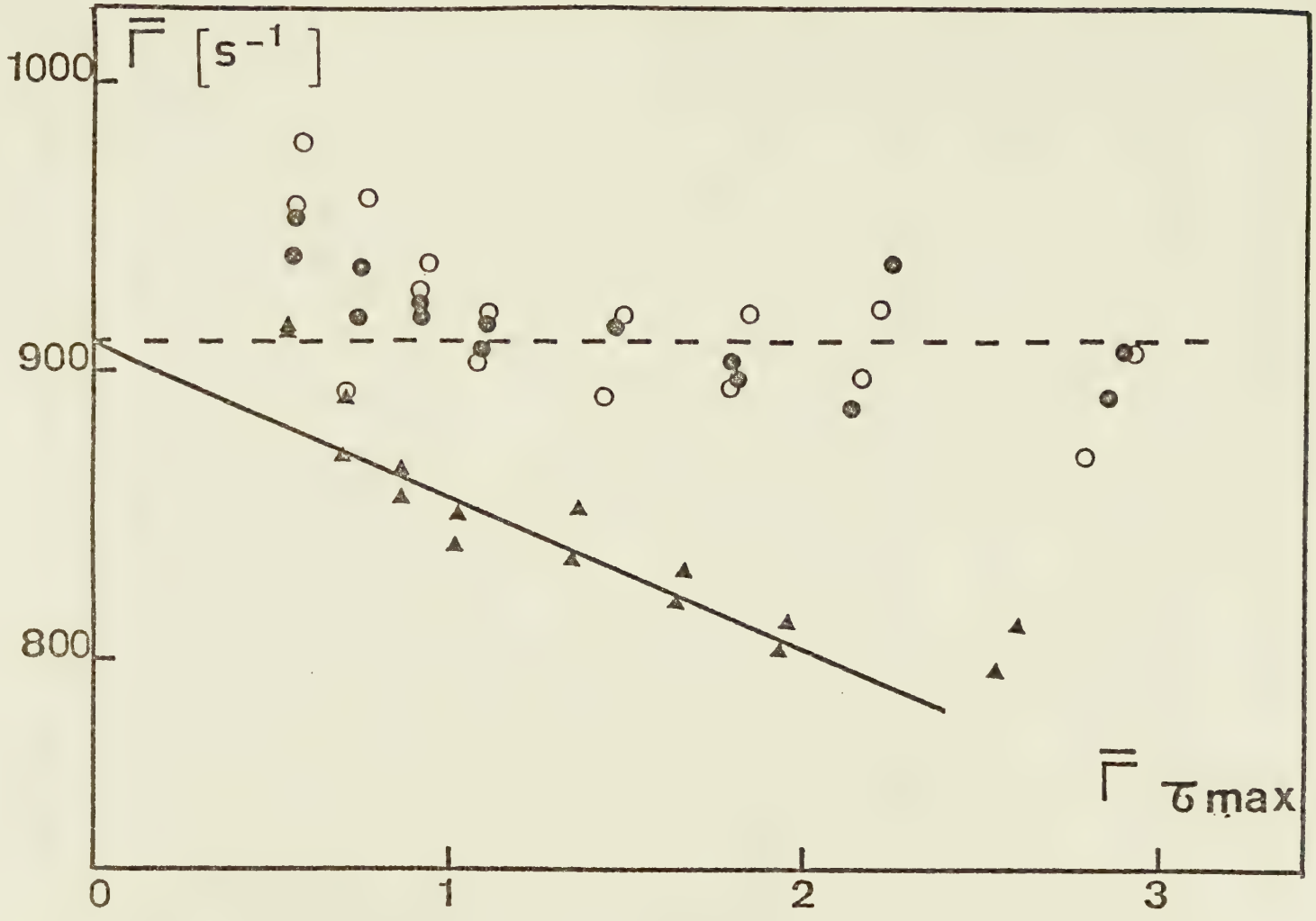
○ : analyse avec un polynome de degré 3

● : " " " " 2

▲ : " " " " 1

Sarcoplasmic Reticulum

▲ linear fit
● quadratic fit
○ cubic fit



il est plus parlant de raisonner sur les diamètres des vésicules plutôt que sur les constantes de vitesse.

Appelons G(d) la fonction de distribution :

$$G(d) = \frac{\Sigma < I_i > \delta(d-d_i)}{\Sigma < I_i >} ,$$

où $<I_i>$ est l'intensité diffusée par la vésicule de diamètre d_i ; comme les vésicules ne sont pas de dimension négligeable devant la longueur d'onde de la lumière, cette intensité s'écrit (Bargeron, 1974) :

$$< I_i > \propto N_i \, |f(d_i)|^2 \, d_i^{\,6} ,$$

avec le facteur de forme :

$$f(d) = \left[3\left(\frac{2}{K\,d}\right)^3\right]\left[\sin\left(\frac{K\,d}{2}\right) - \left(\frac{K\,d}{2}\right)\cos\left(\frac{K\,d}{2}\right)\right] ;$$

N_i est le nombre de vésicules de diamètre d_i.

Les résultats de la D.Q.E.L. exprimés plus haut permettent de définir G(d), comme G(Γ), à partir de ses deux premiers cumulants et si l'on assimile cette distribution à une distribution gaussienne, on a :

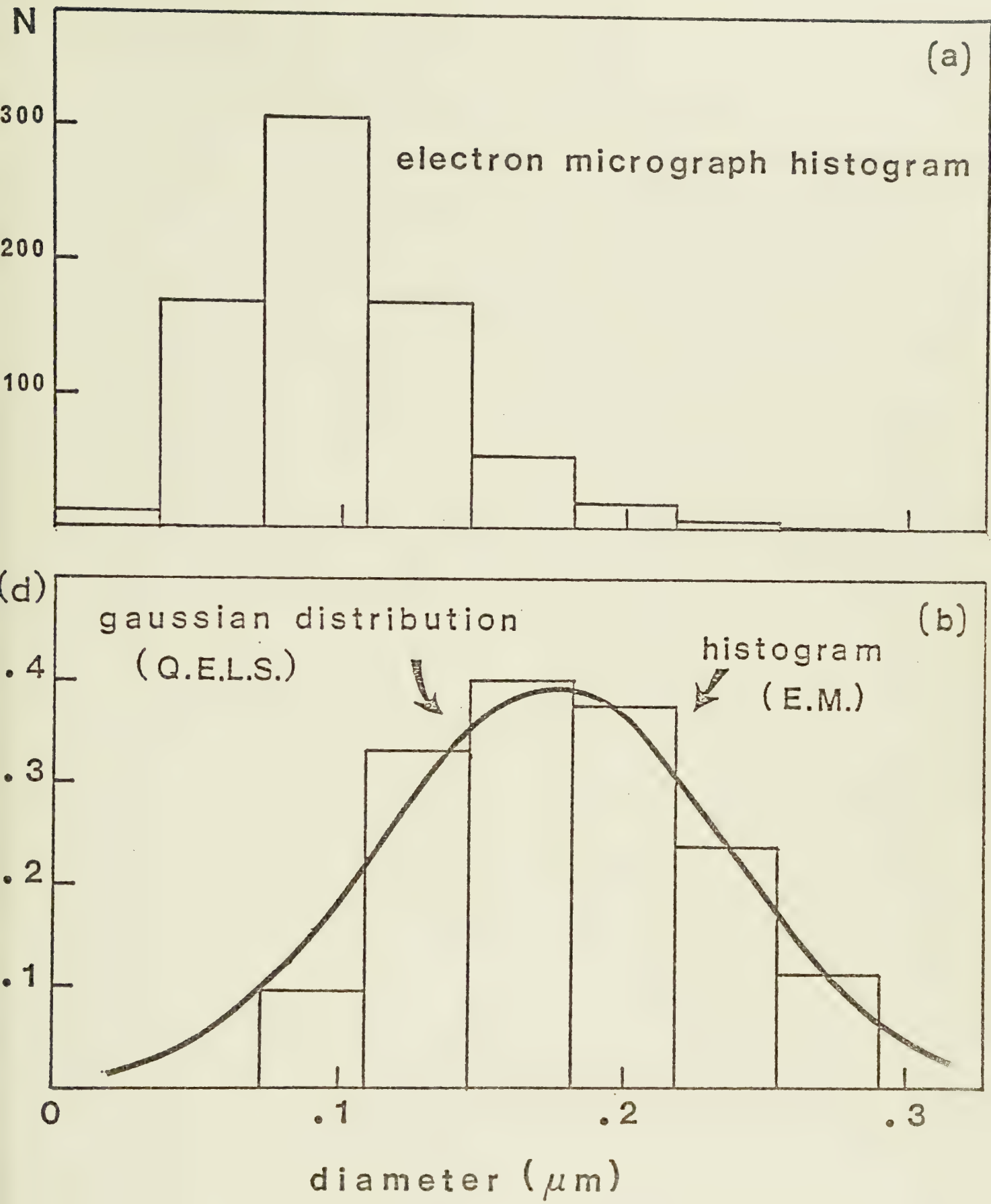
$$G(d) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(d-\bar{d})^2/2\sigma^2} ,$$

avec : $\begin{cases} \bar{d} = 0{,}170\ \mu \\ \sigma = 0{,}060\ \mu \end{cases}$ (figure 5(b)).

Il s'agit maintenant de comparer cette distribution G(d) donnée par la D.Q.E.L. à la distribution en nombre N(d) donnée par les clichés de microscopie électronique. A partir des valeurs N(d) de l'histogramme A (figure 5(a)), on a calculé les valeurs : N(d) f(d) d^6, correspondant aux coefficients d'intensité diffusée < I > ; on obtient ainsi un nouvel histogramme représenté sur la figure 5(b). Si l'on compare cet histogramme, obtenu à partir des données de microscopie électronique, à la distribution gaussienne obtenue par la méthode des cumulants, on peut dire qu'il y a un bon accord entre les résultats donnés par les deux techniques.

Chapitre V - Figure 5 (a) : Répartition des diamètres d'après les clichés de microscopie électronique.

(b) : Distribution des intensités diffusées obtenues à partir :
- de la répartition précédente (histogramme),
- des expériences de diffusion quasi élastique de la lumière (distribution gaussienne).


N
(a)
300
200
100
electron micrograph histogram
(d)
gaussian distribution
(Q.E.L.S.)
(b)
histogram
(E.M.)
.4
.3
.2
.1
0
.1
.2
.3
diameter (μm)

IV - Conclusion

Il est devenu maintenant assez fréquent que dans le cas de micelles, virus, ribosomes etc..., il soit fait une comparaison entre les résultats donnés par la diffusion quasi élastique de la lumière et ceux donnés par la microscopie électronique (Lin et al., 1971 ; French et al., 1969 ; Koppel, 1973). Il est constaté, en général, que les dimensions (diamètre dans le cas de sphères) obtenues à partir de la diffusion quasi élastique de la lumière sont plus grandes que celles obtenues à partir de la microscopie électronique ; cette différence est souvent expliquée par le fait que les molécules en solution comportent une certaine couche d'hydratation qu'il est impossible d'observer par microscopie électronique. Nous pensons que cet argument est valable mais insuffisant pour expliquer de grosses différences de taille et que les solutions (ou les suspensions), bien que purifiées par gradient de sucrose, sont encore polydisperses ; dans ce cas, il n'est pas étonnant que les deux techniques donnent des résultats différents puisque l'une donne une dimension moyenne en nombre (microscopie électronique) et l'autre une moyenne z (D.Q.E.L.).

V - Références bibliographiques pour le chapitre V *

BARGERON, C.B. (1974) - J. Chem. Phys. 61, 2134-2138.

BROWN, J.C., PUSEY, P.N. (1974) - J. Phys. D. Appl. Phys. 7, L 31 - L 35

FRENCH, M.J., ANGUS, J.C., WALTON, A.G. (1969) - Science, 163-345.

KOPPEL, D.E. (1973) - Ph. D. Columbia University.

LIN, S.H.C., DEWAN, R.K., BLOOMFIELD, V.A., MORR, C.V. (1971) - Biochemistry 10, 4788-4793.

MACLENNAN, D.H., HOLLAND, P.C. (1975) - Annual Review of Biophysics and Bioengineering, vol. 4, 377-404.

PUSEY, P.N., KOPPEL, D.E., SCHAEFFER, D.W., CAMERINI-OTERO, R.D., KOENIG, S.H. (1974) - Biochemistry 13, 953-960.

TONOMURA, Y. (1973) - Muscle proteins, muscle contraction and cation transport - University Park Press.

* Ces références ne concernent que les compléments à l'article.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons tenté d'examiner toutes les possibilités que pouvait offrir la diffusion quasi élastique de la lumière dans le domaine de la biologie. Dans ce cas, il était préférable d'étudier divers systèmes d'intérêt biologique ; notre choix s'est porté sur deux enzymes oligomériques (la β-galactosidase et la glutamate déshydrogénase) et sur une préparation de vésicules membranaires de Réticulum Sarcosplasmique. Il faut convenir toutefois que la mise au point très progressive du montage expérimental tout au long de ce travail, ne nous a pas toujours permis d'approfondir au maximum les études abordées.

Les résultats obtenus pour la β-galactosidase sont compatibles avec une structure assez compacte de l'enzyme ; le tétramère peut être assimilé à un ellipsoïde oblate de demi-grand axe 70 Å et de demi-petit axe 35 Å, avec une hydratation de 30%. La présence d'un effecteur de l'enzyme (ions Mg^{2+}) ne modifie pas de façon appréciable la conformation globale alors que les tests d'activité montrent une très nette activation de l'enzyme, cette activation étant maximum pour une concentration d'ions de 1 mM. L'action d'un agent dénaturant à forte concentration (urée 8 M) se traduit par une dissociation en monomères et un dépliement de la chaine polypeptidique.

La glutamate déshydrogénase est un enzyme qui, en solution, a la propriété de se polymériser réversiblement ; pour chaque concentration d'enzyme, sont présents, dans la solution, divers polymères (multiples entiers de l'oligomère) dont les proportions dépendent des constantes d'équilibre des réactions d'association-dissociation. Ce phénomène d'autoassemblage a été beaucoup étudié "in vitro" par les physico-chimistes au moyen de différentes techniques, diffusion de la lumière et ultracentrifugation entre autres ; mais,bien que l'enzyme se trouve en concentration importante dans les mitochondries, il n'est pas encore démontré que ce phénomène joue un rôle de régulation "in vivo". Dans le cas d'un tel système hétérogène, la D.Q.E.L. ne permet de mesurer qu'un coefficient de diffusion de translation moyen D_z. La variation de ce paramètre D_z a été étudiée en fonction de la concentration totale d'enzyme. Les résultats sont compatibles avec un phénomène de polymérisation linéaire avec même constante d'équilibre pour chaque étape d'association. Des mesures effectuées à forte concentration d'enzyme montrent que ce paramètre présente l'avantage d'être assez peu sensible au phénomène de non idéalité.

La taille de vésicules membranaires peut être très facilement étudiée par D.Q.E.L.. L'utilisation d'une méthode d'analyse appelée méthode des cumulants permet d'obtenir un diamètre moyen (moyenne z) ainsi que l'allure de la courbe de répartition des diamètres. La comparaison de cette courbe de répartition avec les histogrammes obtenus à partir des clichés de microscopie électronique montre un parfait accord entre les deux techniques.

Les vésicules de Réticulum Sarcoplasmique conservent la propriété de transporter les ions Ca^{2+} que possède la membrane "in vivo" ; c'est donc un matériel de choix pour étudier les relations entre structure et fonction au niveau des membranes. Les vésicules ont été soumises à deux sortes de traitements : un traitement par un enzyme agissant au niveau des protéines (trypsine) et un traitement par un enzyme agissant au niveau des phospholipides (phospholipase C) ; dans les deux cas la perméabilité de la membrane aux ions Ca^{2+} augmente. Malgré ces traitements, la structure vésiculaire est conservée ; mais il est constaté, aussi bien par microscopie électronique que par D.Q.E.L., une augmentation de la taille des vésicules due probablement à un phénomène de fusion. Il y a sans doute là un moyen pour étudier les rôles respectifs des protéines et des phospholipides au niveau de la tension d'une membrane.

Appliquée à l'étude de problèmes biologiques, la diffusion quasi élastique de la lumière présente quelques avantages particulièrement attrayants :

- C'est une méthode rapide et précise ; il est possible de mesurer un coefficient de diffusion de translation avec une précision de 1% en un temps de l'ordre de la minute.

- Cette méthode permet d'étudier les conformations de systèmes de complexités très diverses, macromolécules ou organites cellulaires, en solution, c'est-à-dire dans des conditions que l'on peut choisir très voisines des conditions physiologiques. Ce n'est pas le cas de techniques telles que la microscopie électronique ou la diffraction des rayons X.

C'est, en particulier, une méthode hydrodynamique simple pour déterminer le pourcentage d'hydratation ou de solvatation d'une macromolécule si la structure tridimensionnelle en est connue.

- La D.Q.E.L. peut être utilisée pour observer les changements de conformation consécutifs soit à la variation de certains paramètres (température, pH, force ionique, etc...), soit à des phénomènes d'intéraction

(fixation de coenzyme ou d'effecteur, polymérisation). L'information obtenue dépendant à la fois de la taille et de la forme de la molécule, il est préférable, pour pouvoir interpréter les résultats sans ambiguité, d'y associer la mesure d'autres grandeurs (intensité diffusée, vitesse de sédimentation par exemple).

- L'aspect le plus séduisant de cette méthode est certainement l'approche dynamique qu'elle permet de certains phénomènes : équilibre chimique, flexibilité de filaments, déformation de membranes cellulaires. Les résultats dans ce domaine sont encore très peu nombreux et même souvent contestés.

Nous citerons, en particulier, une nouvelle méthode, appelée spectroscopie de corrélation de fluorescence qui permet l'observation des fluctuations du nombre d'occupation d'un composé fluorescent à l'intérieur d'un volume éclairé. On peut envisager de l'appliquer à l'étude de phénomènes de régulation au niveau d'un système multienzymatique ou de phénomènes de transport à travers les membranes.

Il faut souhaiter que les progrès futurs tant sur le plan théorique que sur le plan expérimental favoriseront le développement de telles études.